

Université de Sherbrooke

**Rôle de la substance P dans la régulation du récepteur opioïdergique
delta**

Par
Dave Dubois
Département de Physiologie et Biophysique

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de
l'obtention du grade de maître ès sciences (M. Sc.) en Physiologie

Sherbrooke, Québec, Canada
Décembre, 2010

Membres du jury d'évaluation
Louis Gendron, Physiologie
Philippe Sarret, Physiologie
Philippe Goffaux, Sciences Cliniques

© Dave Dubois, 2010



**Library and Archives
Canada**

**Published Heritage
Branch**

**395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada**

**Bibliothèque et
Archives Canada**

**Direction du
Patrimoine de l'édition**

**395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada**

Your file Votre référence

ISBN: 978-0-494-83757-3

Our file Notre référence

ISBN: 978-0-494-83757-3

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.

Canada

Rôle de la substance P dans la régulation du récepteur opioïdergique delta

Par

Dave Dubois

Département de physiologie et biophysique

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention d'un diplôme de maître ès sciences (M.Sc.) en Physiologie, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

À ce jour, les analgésiques de choix dans le traitement de la douleur sont toujours les composés opioïdergiques agissant sur le récepteur mu (MOPR), comme par exemple la morphine. Étant donné les effets secondaires indésirables observés avec ces agonistes, des alternatives ont été envisagées pour traiter la douleur adéquatement tout en réduisant les effets indésirables. Un rôle pour le récepteur opioïdergique delta (DOPR) a été proposé, car son activation engendre moins d'effets secondaires que MOPR. Cependant, la faible efficacité analgésique de ses agonistes limite son utilisation clinique. Les études menées dans le laboratoire du Pr Louis Gendron ont pour but principal d'étudier les rôles de DOPR, sa régulation et ses mécanismes d'action pour contrer la douleur. Chez les rongeurs, il est entre autre possible d'augmenter l'analgésie induite par les agonistes DOPR dans certaines conditions, comme suite à un traitement chronique avec un agoniste MOPR ou lors d'une douleur de type inflammatoire ou neuropathique. En conditions normales, DOPR semble séquestré au niveau intracellulaire, ce qui pourrait expliquer sa faible efficacité analgésique. Cependant, une augmentation de la disponibilité membranaire de DOPR semble corrélée à l'augmentation de ses effets analgésiques. Différentes hypothèses ont été proposées pour expliquer ce phénomène et ce mémoire présente un survol des différents mécanismes de régulation proposés pour DOPR en s'attardant principalement sur le rôle possible de la substance P. Ce neuropeptide a en effet été décrit comme étant essentiel pour permettre l'expression membranaire de DOPR et ainsi permettre l'analgésie via ce récepteur. Cependant, des différences dans la localisation de la substance P et de DOPR ont été soulevées. Mon étude évalue donc le rôle de la substance P dans l'analgésie produite par des agonistes DOPR dans un modèle de douleur inflammatoire. Les résultats obtenus ici démontrent que la substance P ne semblent pas essentielle pour permettre la compétence fonctionnelle de DOPR. Cela suggère donc l'existence de mécanismes de régulation de DOPR indépendants de la substance P. Il ne semble donc pas y avoir un seul et unique mécanisme responsable de la régulation de DOPR, différentes hypothèses sont explorées dans ce mémoire.

Mots clés : Douleur, Récepteur opioïde delta, Substance P, Antihyperalgésie, Adjuvant complet de Freund, Inflammation, Adressage membranaire

Table des matières

Table des matières	III
Liste des figures et tableaux.....	V
Liste des abréviations	VI
1 Introduction.....	1
1.1 Douleur	1
1.1.1 Transmission de la douleur	1
1.2 Traitement de la douleur en clinique : Opioïdes	5
1.2.1 Récepteur opioïdergique mu	5
1.2.2 Récepteur opioïdergique kappa.....	7
1.2.3 Récepteur opioïdergique delta.....	8
1.3 Localisation du récepteur opioïdergique delta.....	9
1.4 Fonctions du récepteur opioïdergique delta.....	11
1.5 Adressage membranaire de DOPR et analgésie	13
1.5.1 Rôle du récepteur opioïdergique mu	13
1.5.2 Rôle du récepteur opioïdergique kappa.....	16
1.5.3 Modèle de douleur inflammatoire.....	16
1.5.4 Modèle de douleur neuropathique.....	18
1.5.5 Voie constitutive et voie régulée des RCPG	20
1.5.6 Stimuli permettant la relâche de neuropeptides	22
1.6 Mécanismes potentiels de régulation de l'adressage de DOPR.....	29
1.6.1 Problème de maturation du récepteur.....	29
1.6.2 Hétérodimères MOPR-DOPR.....	31
1.6.3 Protéines chaperonnes	32
1.7 Substance P	34
1.7.1 Fonction et localisation de la substance P	36
1.7.2 Lien possible entre la substance P et le récepteur delta	37
2. Objectifs du Projet	39
3 Article	41
4 Matériel et méthodes (hors article)	71
4.1 Génération de la colonie de souris PPTA	71
4.2 Microscopie électronique.....	72
5 Résultats (hors article)	74
5.1 Localisation de DOPR par microscopie électronique.....	74
6. Discussion	76
6.1 Retour sur l'article	76
6.2 Régulation de du récepteur opioïdergique delta par la substance P.....	76
6.3 Rôle de la substance P dans l'inflammation induite par le CFA	77
6.4 Co-expression du récepteur opioïdergique delta et de la substance P	78
6.5 Techniques alternatives pour localiser le récepteur opioïdergique delta.....	81
6.5.1 Ligand fluorescent ω -Bodipy red-[D-Ala ²]-deltorphan I	81
6.5.2 Marqueurs d'affinité pour le récepteur opioïdergique delta.....	81
6.5.3 Destruction sélective de fibres afférentes.....	82

6.6 Régulation du récepteur opioïdérique delta	84
6.6.1 Maturation du récepteur opioïdérique delta	84
6.6.2 Hétérodimères MOPR-DOPR	85
6.6.3 Protéines chaperonnes	87
6.7 Dichotomie des effets antinociceptifs et antihyperalgésiques	88
6.8 Génération de la douleur thermique et mécanique	90
6.8.1 Rôle de la substance P	90
6.8.2 Rôle du récepteur opioïdérique delta	90
7 Conclusion	92
8 Remerciements	93
9 Liste des publications	95

Liste des figures et tableaux

Figure 1 Les trois grandes catégories de fibres afférentes primaires.....	3
Figure 2 Fibres afférentes C peptidergiques et non-peptidergiques.....	4
Figure 3 Connexions entre les afférences primaires et la moelle épinière	5
Figure 4 Voies ascendantes de la douleur.....	6
Figure 5 Échelle des traitements utilisés cliniquement contre la douleur	7
Figure 6 Modèle de l'organisation des récepteurs opioïdiques	8
Figure 7 Immunohistochimie de moelles épinières de souris sauvages et déficientes en DOPR avec un anticorps anti-DOPR	11
Figure 8 Mécanismes d'internalisation et de recyclage de DOPR.....	13
Figure 9 Représentation schématique de l'essai d'internalisation d'un récepteur induit par un ligand fluorescent.	14
Figure 10 Voies de sécrétion empruntées par les RCPGs	21
Figure 11 Modèle de relâche de neuropeptides par LDCV et insertion membranaire de DOPR	23
Figure 12 Stimuli connus pour augmenter la densité membranaire de DOPR.....	24
Figure 13 Modèle proposé pour le triage de DOPR dans la voie de sécrétion régulée	35
Figure 14 Structure du gène de la préprotachykinine A (PPTA) et des tachykinines	37
Figure 15 Localisation proposée des récepteurs opioïdiques dans les afférences primaires	38
Figure 16 Exemple de gel d'agarose 2.5% de produits de réaction PCR de souris PPTA ^{-/-} et PPTA ^{+/+}	72
Figure 17 Localisation de DOPR dans les laminae superficielles de la corne dorsale de moelle épinière par microscopie électronique	75

Tableau 1 Changements dans l'adressage membranaire de DOPR observés <i>in vivo</i>	20
---	----

Liste des abréviations

AMPC	Adénosine monophosphate cyclique
ATP	Adénosine triphosphate
CFA	Adjuvant complet de Freund
CGRP	Peptide relié au gène de la calcitonine
DRG	Ganglion rachidien
DOPR	Récepteur opioïdergique delta
GASP	Protéine de triage associée aux récepteurs couplés aux protéines G
GFP	Protéine fluorescente verte
IB4	Isolectine B4
ICV	Intracérébroventriculaire
KOPR	Récepteur opioïdergique kappa
LDCV	Vésicules à corps denses
MOPR	Récepteur opioïdergique mu
NGF	Facteur de croissance neuronal
NHERF-1	Facteur de régulation de l'échangeur Na ⁺ /H ⁺
NKA	Neurokinine A
PAG	Substance grise périaqueducule
PKA	Protéine kinase A
PKC	Protéine kinase C
PPTA	Préprotachykinine A
RCPG	Récepteur couplé aux protéines G
RE	Réticulum endoplasmique
RVM	Médulla rostro-ventrale
SP-SAP	Substance P - Saporine
TGN	Réseau trans-Golgi
TRPV1	Récepteur vanilloïde de type 1

1 Introduction

1.1 Douleur

La douleur est une expérience que l'on perçoit tous à différents degrés au cours de notre vie. Quoique désagréable, elle est néanmoins nécessaire à l'organisme. La douleur est en effet un phénomène physiologique normal utilisé par l'organisme pour se protéger face à certains stimuli. Selon l'Association Internationale sur l'Étude de la Douleur (IASP), la douleur se définit comme « une expérience sensorielle et émotionnelle désagréable associée à une lésion tissulaire réelle ou potentielle ou décrite comme telle ». La douleur est donc un mélange de composantes physiologiques et psychologiques. Cependant, lorsque celle-ci persiste sur une longue période de temps, elle peut devenir pathologique. Il s'agit alors de douleur chronique. Elle peut être de différentes natures, soit inflammatoire, neuropathique ou même cancéreuse, mais demeure néanmoins un problème important dans la population. Selon Statistiques Canada, dans la population à domicile, 16% des personnes âgées entre 18 et 64 ans ainsi que 27% des personnes âgées de plus de 65 ans disent souffrir de douleur chronique. Des douleurs de plus en plus intenses vont aussi interférer avec les activités quotidiennes de la personne, d'où l'importance de la traiter de façon adéquate. De nouveaux médicaments sont constamment développés pour le traitement de la douleur. Malheureusement, aucun de ceux-ci ne semble pleinement efficace dans le traitement de la douleur. Les opioïdes agissant sur le récepteur opioïdergique mu (MOPR) restent toujours les analgésiques les plus puissants connus à ce jour. Cependant, leur utilisation entraîne différents effets indésirables et une alternative serait donc nécessaire pour mieux traiter les personnes souffrant de douleur.

1.1.1 Transmission de la douleur

La perception de la douleur, ou nociception, provient de l'activation de certains neurones, les afférences primaires, en réponse à divers stimuli. Différentes afférences primaires sont retrouvées en périphérie, particulièrement au niveau de la peau. Ces

neurones peuvent être classifiés de plusieurs façons, soit en fonction de leurs propriétés morphologiques, des différents marqueurs cellulaires qu'ils expriment, ou des types de stimuli les activant (Figure 1). Les neurones qui répondent à des stimuli non-nociceptifs comme le toucher sont myélinisés, de large diamètre et ont une vitesse de conduction très rapide. Ils contiennent généralement des neurofilaments (NF200) et sont appelés fibres A β (Julius et Basbaum, 2001, Ruscheweyh et al., 2007, Basbaum et al., 2009). Les nocicepteurs quant à eux, sont de diamètre plus petit et sont généralement divisés en deux catégories, les fibres A δ (moyen diamètre, faiblement myélinisées et vitesse de conduction moyenne) et les fibres C (petit diamètre, non-myélinisées et vitesse de conduction lente) (Julius et Basbaum, 2001, Ruscheweyh et al., 2007, Basbaum et al., 2009). Les neurones de petits diamètres peuvent être aussi discriminés en fonction des différents marqueurs qu'ils expriment (Figure 2). En effet, les neurones peptidergiques expriment la substance P, le CGRP (peptide relié au gène de la calcitonine) ainsi que TrkA, le récepteur du facteur de croissance neuronale NGF (Averill et al., 1995). Tandis que les fibres non-peptidergiques lient l'isolectine B4 (IB4), expriment le récepteur purinergique P2X₃ ainsi que le récepteur Ret, le récepteur du GDNF (*glial-derived neurotrophic factor*) (Bennett et al., 1998). Ces différents nocicepteurs peuvent être activés par des stimuli thermiques, mécaniques ainsi que chimiques. Dépendamment de l'intensité du stimulus, certaines populations de neurones peuvent être activées ou non (Julius et Basbaum, 2001, Basbaum et al., 2009). En effet, pour la douleur thermique, par exemple, le seuil d'activation de la plupart des nocicepteurs se situe aux alentours de 43°C. Cependant, une sous-population de fibres A δ n'est activée qu'à des températures avoisinant 53°C. La diversité des stimuli permet donc l'activation de différentes populations de neurones. La plupart des neurones qui jouent un rôle dans la douleur thermique expriment des récepteurs ionotropiques activés par des membres de la famille des vanilloïdes (TRPV), comme le TRPV1, le récepteur de la capsaïcine (Caterina et al., 1997, Guo et al., 1999, Michael et Priestley, 1999, Amaya et al., 2003).

Les différentes afférences primaires projettent au niveau de la matière grise de la moelle épinière. Les corps cellulaires de ces neurones sont situés dans les ganglions rachidiens (DRG). Il existe une organisation précise et structurée de la moelle épinière. Les différentes populations de neurones ciblent précisément des neurones de certaines

laminae (Figure 3). Les fibres non-nociceptives (fibres A β) projettent au niveau des laminae III, IV et V comparativement aux fibres A δ qui projettent vers les laminae I et V. Les fibres C, quant à elles, vont projeter vers les laminae I et II. Les neurones peptidergiques et non-peptidergiques sont aussi discriminés en fonction des laminae vers lesquelles ils projettent. En effet, les fibres peptidergiques activent principalement des neurones de second ordre de la lamina I ainsi que de la partie externe de la lamina II. D'un autre côté, les neurones non-peptidergiques vont principalement projeter vers la partie interne de la lamina II. Cette stratification précise des neurones de la moelle épinière permet la discrimination des différents types de fibres afférentes ainsi que des différents types de stimuli les activant (Braz et al., 2005, Braz et Basbaum, 2009).




Primary afferent axons	Thermal threshold	Vitesse de conduction
 Aα and Aβ fibres Myelinated Large diameter Proprioception, light touch	None	37-75 m/s
 Aδ Fibres Lightly myelinated Medium diameter Nociception (mechanical, thermal, chemical)	- 53°C Type I - 43°C Type II	6-25 m/s
 C Fibres Unmyelinated Small diameter Innocuous temperature, itch Nociception (mechanical, thermal, chemical)	- 43°C	1 m/s

Figure 1 Les trois grandes catégories de fibres afférentes primaires (Tirée et adaptée de (Julius et Basbaum, 2001)). Les fibres non-nociceptives, majoritairement A β sont myélinisées et de large diamètres. Elles sont activées en réponse au toucher et ont une vitesse de conduction très rapide (37-75 m/s). De plus, comparativement aux fibres nociceptives, les fibres A β ne sont pas activées par un stimulus thermique. Les fibres nociceptives comprennent les fibres faiblement myélinisées A δ de moyen diamètre qui ont une vitesse de conduction intermédiaire (6-25 m/s). Ces fibres peuvent être activées par des stimuli nociceptifs mécaniques, chimiques ou thermiques. Cependant, il existe deux types de fibres A δ réagissant à des stimuli thermiques, une première catégorie activée à des températures de 53°C, et une autre activée à 43°C. Finalement, les fibres C sont des fibres nociceptives non-myélinisées et de petit diamètre ayant une vitesse de conduction lente en comparaison aux autres fibres (1 m/s). Elles répondent aussi à des stimuli nociceptifs de tous genres, réagissant entre autres à des températures de 43°C.

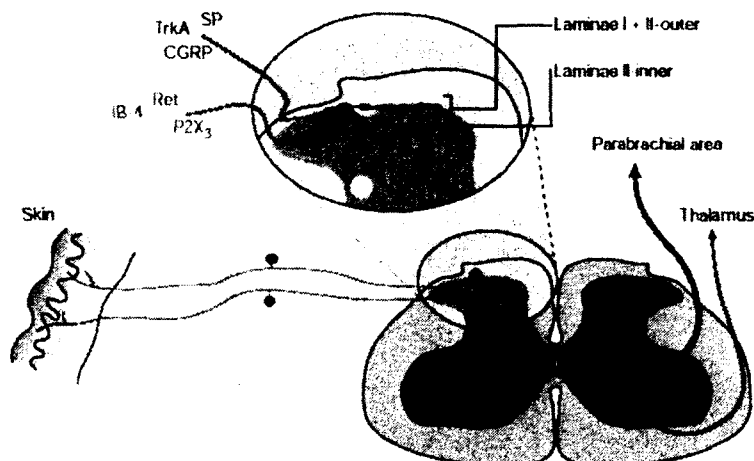


Figure 2 Fibres afférentes C peptidergiques et non-peptidergiques (Tirée et adaptée de (Hunt et Mantyh, 2001)). Les neurones peptidergiques (mauve) expriment le CGRP, la substance P (SP) ainsi que le récepteur TrkA (récepteur du NGF). Ces neurones sont situés en périphérie et vont cibler des neurones de la corne dorsale de la moelle épinière, principalement ceux des laminae I et II externe. Les neurones non-peptidergiques (vert) vont quant à eux cibler des neurones de la partie interne de la lamina II de la corne dorsale de la moelle épinière. Ces neurones expriment le récepteur purinergique P2X₃ et le récepteur Ret (récepteur du GDNF) en plus de pouvoir lier l'isolectine B4 (IB4).

Les neurones de la corne dorsale de la moelle épinière sont le point de départ de plusieurs voies ascendantes qui transportent l'information nociceptive jusqu'à différentes zones du cerveau (Figure 4) (Hunt et Mantyh, 2001, Basbaum et al., 2009). Certains neurones transmettent l'information au cortex somatosensoriel via le thalamus et sont responsables de déterminer la localisation et l'intensité du stimulus (voie spinothalamique). D'autres neurones vont plutôt projeter vers les cortex cingulaire et insulaire via le noyau parabrachial et l'amygdale et être responsables, entre autres, de l'aspect émotif de la douleur (voie spinoparabrachiale). Des neurones vont aussi projeter vers la substance grise périaqueducule (PAG) et la médulla rostro-ventrale (RVM) engageant des voies descendantes inhibitrices de la douleur. D'autres voies descendantes sont aussi activées à partir de l'hypothalamus et de l'amygdale, projetant au niveau de la PAG et de la RVM et permettant ainsi de contrôler les réponses analgésiques.

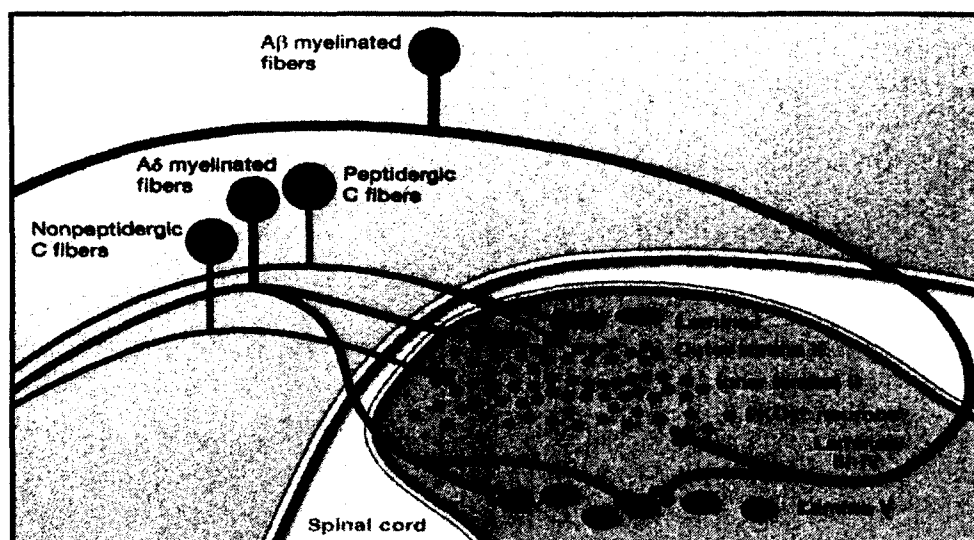


Figure 3 Connexions entre les afférences primaires et la moelle épinière (Tirée de (Basbaum et al., 2009)). La corne dorsale de la moelle épinière est organisée de façon très précise. Les différentes afférences primaires ciblent des neurones des laminae superficielles de la moelle épinière. Les fibres A β ciblent principalement des neurones des laminae III-IV et V. Quant à elles, les fibres A δ établissent des connexions principalement avec des neurones des lamina I et V. Les fibres C non-peptidergiques vont plutôt cibler des neurones de la partie interne de la lamina II. Finalement, les fibres C peptidergiques vont activer des neurones de la lamina I ainsi que des neurones de la couche externe de la lamina II.

1.2 Traitement de la douleur en clinique : Opioïdes

1.2.1 Récepteur opioïdérique mu

Comme mentionné préalablement, les agonistes opioïdériques qui agissent sur MOPR sont le principal traitement contre la douleur utilisé en clinique (McQuay, 1999, Breivik, 2001). Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), différents analgésiques non-opioïdériques peuvent être utilisés pour traiter des douleurs de faible intensité (anti-inflammatoires non-stéroïdiens). Cependant, lorsque la douleur persiste ou s'intensifie, un traitement avec des analgésiques agissant sur MOPR (codéine pour intensité modérée ou morphine pour intensité sévère) constitue toujours la meilleure thérapie (Figure 5). L'utilisation des agonistes MOPR entraîne par contre plusieurs effets secondaires indésirables tel que la dépression respiratoire, la constipation, la nausée, la sédation et la tolérance (Colpaert, 1996, Kreek, 1996). Ces agonistes présentent aussi un

potentiel d'abus et de dépendance important (Colpaert, 1996, Kreek, 1996). Il semble donc important de trouver une alternative à ces composés dans le traitement de la douleur (McQuay, 1999). Dans la famille des récepteurs opioïdiques, on retrouve aussi le récepteur kappa (KOPR) et le récepteur delta (DOPR). Ces récepteurs sont des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G (RCPG) (Kieffer, 1999, Kane et al., 2006). Ces trois récepteurs présentent environ 60% d'homologie entre eux (Figure 6) et semblent tous impliqués dans le contrôle de la douleur. Le potentiel analgésique des agonistes de DOPR et KOPR a donc été étudié.

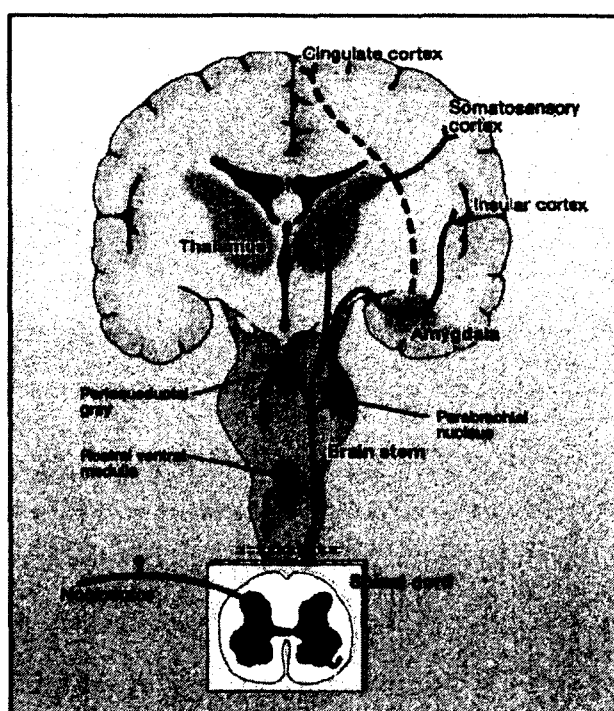


Figure 4 Voies ascendantes de la douleur (Tirée de (Basbaum et al., 2009)). Les neurones de la corne dorsale de la moelle épinière activés par les afférences primaires vont conduire l'information nociceptive aux zones supérieures en empruntant différentes voies. Une partie de ces neurones vont activer le cortex somatosensoriel via le thalamus, l'informant sur la localisation et l'intensité du stimulus. Une autre voie ascendante importante origine du noyau parabrachial et active les cortex insulaire et cingulaire via l'amygdale, jouant un rôle dans l'aspect émotif de la douleur. Finalement, des neurones provenant de la moelle épinière vont activer des neurones dans la médulla rostro-ventrale (RVM) et dans la substance grise périaqueducule (PAG) engageant des voies inhibitrices descendantes.

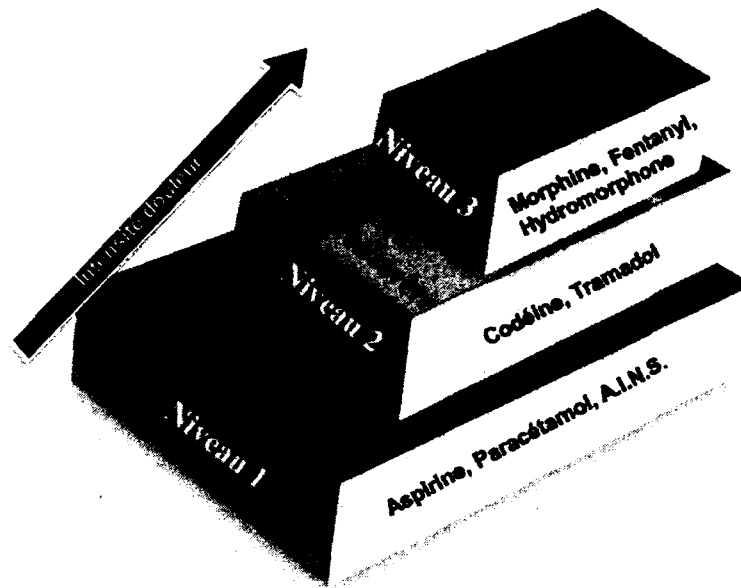


Figure 5 Échelle des traitements utilisés cliniquement contre la douleur (Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), 2009). Les différents traitements se divisent en trois niveaux en fonction de l'intensité de la douleur ressentie. Au premier niveau, pour une douleur qualifiée de faible à modérée, les analgésiques non-opioïdiques comme les anti-inflammatoires non-stéroïdiens sont préconisés. Lorsque la douleur s'intensifie et qu'elle est qualifiée de modérée à sévère, ce sont des opioïdes légers comme la codéine et le tramadol qui sont prescrits. Finalement, lorsque la douleur est sévère et que les autres traitements ne peuvent être efficaces, des opioïdes forts sont utilisés comme la morphine, le fentanyl ou hydromorphone.

1.2.2 Récepteur opioïdique kappa

Le récepteur kappa a été cloné au début des années 1990 (Chen et al., 1993, Meng et al., 1993, Yasuda et al., 1993). L'utilisation d'agonistes sélectifs KOPR permet d'induire de l'analgésie chez les animaux (Cowan et al., 1988, Schepers et al., 2008, Vanderah, 2010, Wang et al., 2010b). Cependant, leur utilisation clinique est grandement limitée due à ses effets secondaires indésirables. En effet, au niveau central, l'activation de KOPR entraîne des effets désagréables, principalement de la dysphorie (Pfeiffer et al., 1986, Vanderah, 2010, Wang et al., 2010b). L'utilisation d'agonistes KOPR doit donc être limitée à la périphérie pour éviter l'apparition d'effets néfastes, ce qui limite son potentiel comme cible analgésique clinique (Cowan et al., 1988, Vanderah, 2010, Wang et al., 2010b).

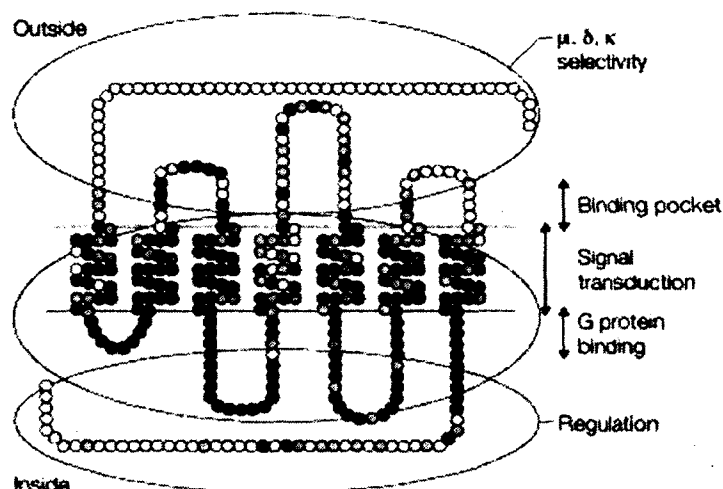


Figure 6 Modèle de l'organisation des récepteurs opioïdiergiques (Tirée de Textbook of Pain, Wall et Melzack, 5e Édition – www.textbookofpain.com). Chaque cercle représente un acide aminé. Les cercles bleus foncés représentent les acides aminés qui sont conservés dans les trois types de récepteurs opioïdiergiques. Les cercles bleus pâles représentent des résidus hautement conservés entre les différents RCPGs de la famille A. Tandis que les cercles blancs représentent quant à eux les acides aminés spécifiques pour chacun des récepteurs opioïdiergiques. La partie extracellulaire N-terminale et les boucles extracellulaires sont responsables de la sélectivité des récepteurs, tandis que la partie C-terminale intracellulaire est responsable des mécanismes de régulation des récepteurs.

1.2.3 Récepteur opioïdiergique delta

Le récepteur delta a quant à lui été cloné en 1992 (Evans et al., 1992, Kieffer et al., 1992). L'activation de ce récepteur peut aussi produire de l'analgésie chez les animaux, cependant celle-ci est moins importante que l'analgésie produite suite à l'activation de MOPR (Porreca et al., 1984, Mattia et al., 1991, 1992, Malmberg et Yaksh, 1992, Stewart et Hammond, 1993, Gallantine et Meert, 2005). Néanmoins, les effets indésirables (constipation, dépression respiratoire, nausée, sédation) et le potentiel d'abus et de dépendance observés avec les agonistes DOPR sont minimes ou nuls en comparaison à ceux observés avec des agonistes MOPR (Porreca et al., 1984, May et al., 1989, Mattia et al., 1991, Szeto et al., 1999, Brandt et al., 2001, Hutcheson et al., 2001, Petrillo et al., 2003, Gallantine et Meert, 2005, Codd et al., 2009). Aussi, la tolérance observée suite à l'activation répétée de DOPR est moins importante que lors de l'activation répétée de MOPR (Mika et al., 2001, Petrillo et al., 2003, Beaudry et al.,

2009). Le potentiel analgésique des agonistes DOPR a aussi été montré cliniquement face à des douleurs cancéreuses (Onofrio et Yaksh, 1983, Moulin et al., 1985, Krames et al., 1986). Dans l'ensemble, DOPR présente des caractéristiques analgésiques intéressantes et des effets secondaires limités. Il pourrait donc représenter une bonne alternative pour le traitement de la douleur (Mika et al., 2001, Cahill et al., 2003, Gaveriaux-Ruff, 2009, Vanderah, 2010).

1.3 Localisation du récepteur opioïdérique delta

Le rôle de DOPR dans l'inhibition de la nociception est confirmé par sa localisation dans certaines zones impliquées de façon importante dans la nociception. En effet, au niveau du cerveau on le retrouve entre autres dans la PAG, la RVM, le néocortex, le noyau accumbens, l'hypothalamus et l'amygdale (Mansour et al., 1994, 1995, Arvidsson et al., 1995, Cahill et al., 2001a, Commons et al., 2001, Pradhan et Clarke, 2005). Des études par immunohistochimie, par autoradiographie ou par hybridation *in situ* chez le rongeur ont montrées une expression importante dans la matière grise de la moelle épinière (Besse et al., 1990, Stevens et al., 1991, Dado et al., 1993, Mansour et al., 1994, Arvidsson et al., 1995, Elde et al., 1995, Ji et al., 1995, Zhang et al., 1998, Cahill et al., 2001a, Wang et Wessendorf, 2001, Mennicken et al., 2003, Pradhan et Clarke, 2005). Plus précisément, chez ces animaux l'expression de DOPR serait importante dans les laminae superficielles de la corne dorsale ainsi que dans les neurones moteurs. Toujours chez les rongeurs, la présence de DOPR peut être observée dans les neurones de DRG de tous les types et de tous les diamètres (Dado et al., 1993, Mansour et al., 1994, Ji et al., 1995, Minami et al., 1995, Zhang et al., 1998, Wang et Wessendorf, 2001, Mennicken et al., 2003). Des différences de localisation entre les espèces ont cependant été remarquées (Mennicken et al., 2003). Ainsi, chez l'humain, DOPR est principalement localisé au niveau des afférences primaires de faible et moyen diamètre et semble peu localisé dans les neurones de la moelle épinière (Mennicken et al., 2003).

On retrouve aussi MOPR au niveau des afférences primaires et des neurones de la moelle épinière. Plus précisément, on observe que MOPR est présent dans les neurones

de DRG de tous les diamètres ainsi que dans les laminae superficielles de la matière grise de la moelle épinière (Maekawa *et al.*, 1994, Wang et Wessendorf, 2001, Scherrer et al., 2009, Wang et al., 2010a). La co-expression de DOPR avec MOPR, a de plus été observée dans la moelle épinière ainsi que dans les neurones de DRG (Ji et al., 1995, Wang et Wessendorf, 2001, Joseph et Levine, 2010, Wang et al., 2010a).

Cependant, chez le rongeur, une étude récente a remis en doute les résultats de co-localisation de ces récepteurs obtenus avec des anticorps dirigés contre DOPR (Scherrer et al., 2009). En effet, il semblerait que les anticorps commercialement disponibles ciblant spécifiquement DOPR montrent un patron d'expression semblable chez des souris invalidées pour DOPR (Figure 7) (Scherrer et al., 2009). De plus, en utilisant des souris *knock-in* pour DOPR couplées avec une protéine fluorescente GFP (*Green Fluorescent Protein*; DOReGFP) (Scherrer et al., 2006), ils obtiennent un patron d'expression de DOPR différent de celui décrit dans la littérature. Au niveau des afférences primaires, DOPR serait principalement exprimé par les neurones myélinisés non-peptidergiques ainsi que ceux de gros calibre (Scherrer et al., 2009). Ainsi, DOPR serait absent des afférences primaires exprimant la substance P et le CGRP (Mennicken et al., 2003, Scherrer et al., 2009). Avec cet outil, une absence de co-expression entre DOPR et MOPR est aussi observée, comme préalablement suggéré par un autre groupe (Cheng et al., 1997, Wang et Pickel, 2001). Par contre, la présence d'hétérodimères MOPR-DOPR a aussi été suggérée (Gomes et al., 2000, 2004, McVey et al., 2001, Fan et al., 2005, Law et al., 2005, Wang et al., 2005, Hasbi et al., 2007) et la formation de ces hétérodimères chez les rongeurs a été démontrée à l'aide d'anticorps sélectifs contre l'hétérodimère MOPR-DOPR (Gupta et al., 2010). Bref, la localisation de DOPR et sa co-expression possible avec MOPR reste un sujet controversé et d'autres études sont nécessaires afin de mieux interpréter les différences entre ces résultats.

En regardant au niveau cellulaire, on observe une localisation majoritairement intracellulaire de DOPR (Cheng et al., 1995, 1997, Elde et al., 1995, Ji et al., 1995, Zhang et al., 1998, Cahill et al., 2001a). On retrouve en effet un très faible pourcentage de récepteurs disponibles à la membrane plasmique. Cette localisation inhabituelle pour un RCPG pourrait expliquer la faible efficacité analgésique des agonistes DOPR chez des animaux sains. Différentes hypothèses ont été avancées pour expliquer cette localisation.

La principale étant que DOPR serait associé avec des vésicules à corps dense, les LDCV (Cheng et al., 1995, Zhang et al., 1998, Bao et al., 2003, Guan et al., 2005). Ces vésicules contiennent différents neurotransmetteurs et font parties de la voie de sécrétion régulée (Merighi et al., 1988, Salio et al., 2007). Suite à leur synthèse, elles restent au niveau intracellulaire. Elles sont transportées à la membrane plasmique seulement en réponse à certains stimuli pour ainsi permettre la relâche de leur contenu par exocytose (Seward et al., 1995, de Wit, 2010). Cependant, plusieurs études observent peu de DOPR présents dans les LDCV, les récepteurs étant plutôt associés avec d'autres types de vésicules intracellulaires (Cahill et al., 2001a, Gendron et al., 2006). Il reste néanmoins que le peu de DOPR localisé au niveau membranaire pourrait influencer la faible efficacité analgésique des agonistes opioïdiques.

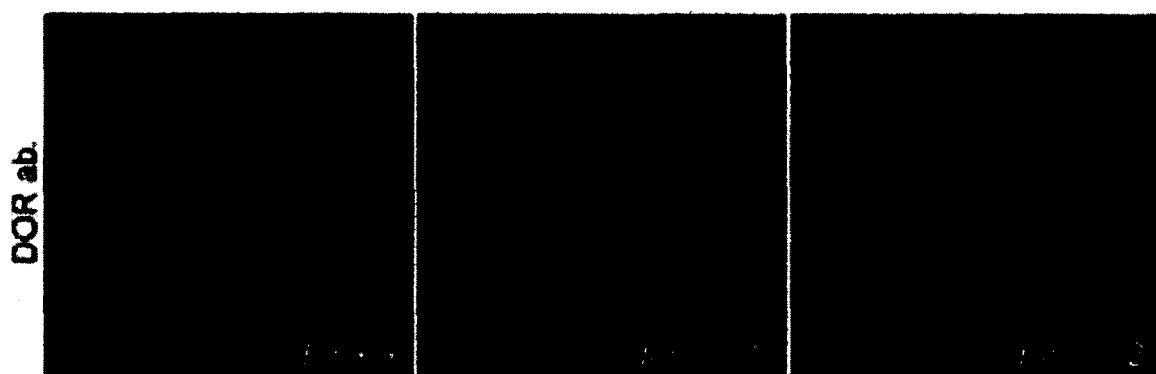


Figure 7 Immunohistochimie de moelles épinières de souris sauvages et déficientes en DOPR avec un anticorps anti-DOPR (Tirée de (Scherrer et al., 2009)). Des moelles épinières de souris sauvages (dor +/+) et de deux lignées de souris déficientes en DOPR (dor -/- (1) et dor -/- (2)) ont été marquées avec un anticorps ciblant la partie 3-17 en N-terminale de DOPR. Le marquage obtenu est le même dans les 3 types de souris. Ce résultat remet en doute la spécificité de cet anticorps contre DOPR, qui semble plutôt reconnaître une autre molécule que le récepteur.

1.4 Fonctions du récepteur opioïdique delta

Le récepteur delta peut être activé par divers agonistes. Les ligands endogènes ayant une bonne affinité pour DOPR sont principalement les enképhalines (met-enképhaline et leu-enképhaline) (Janecka et al., 2004). Plusieurs agonistes sélectifs pour

DOPR ont été synthétisés, tant des agonistes peptidergiques (DPDPE et Deltorphine II par exemple) (Janecka et al., 2004) que des agonistes non-peptidergiques (SNC-80 par exemple) (Bilsky et al., 1995, Calderon et Coop, 2004).

Lorsqu'un agoniste se lie au récepteur, ce dernier est internalisé à l'aide de différentes protéines (Figure 8) (Arttamangkul et al., 2000, Trapaidze et al., 2000, Lee et al., 2002, Eisinger et Schulz, 2005, Bie et Pan, 2007, Cahill et al., 2007, von Zastrow, 2010). Premièrement, DOPR subit un changement de conformation suite à la liaison du ligand, ce qui permet sa phosphorylation par des kinases des récepteurs couplés aux protéines G (GRK) (Guo et al., 2000, Schulz et al., 2002, Li et al., 2003). Il s'en suit le recrutement d'une protéine β -arrestine favorisant la désensibilisation du récepteur (Kovoor et al., 1997, Cheng et al., 1998, Zhang et al., 1999, Cen et al., 2001, Lowe et al., 2002). Le complexe récepteur-ligand peut alors être internalisé par endocytose via des puits de clathrine (Bennett et al., 1985, Trapaidze et al., 1996, Chu et al., 1997). Le récepteur delta internalisé peut ensuite être recyclé à la membrane plasmique ou dirigé vers les lysosomes (Quock et al., 1999, Eisinger et Schulz, 2005, Drake et al., 2006, Cahill et al., 2007) ou le protéasome (Chaturvedi et al., 2001, Yadav et al., 2007) pour être dégradé. Il a cependant été montré que le DOPR favorise la voie de dégradation par les lysosomes au dépend du recyclage du récepteur (Tsao et von Zastrow, 2000, Chaturvedi et al., 2001, Tanowitz et Von Zastrow, 2002, Whistler et al., 2002). Différentes voies de signalisation peuvent être activées par DOPR. Il est couplé à une protéine G de la famille $G\alpha_{i/o}$ (Quock et al., 1999) et permet une diminution des niveaux intracellulaires d'AMPc (Adénosine monophosphate cyclique) (Costa et al., 1985, Izenwasser et al., 1993, Knapp et al., 1995). L'activation de DOPR permet aussi le déclenchement de différentes cascades intracellulaires, entre autre celles impliquant les MAP kinases (*mitogen-activated protein*), la protéine kinase Akt (protéine kinase B) ou encore la phospholipase C (PLC) (Quock et al., 1999, Eisinger et Ammer, 2008, Heiss et al., 2009). De plus, l'activité de canaux ioniques peut être modifiée par DOPR comme c'est le cas avec certains canaux potassique (GIRK), calciques (de type N) ou dépendant de l'hyperpolarisation (I_H) (Ingram et Williams, 1994, Quock et al., 1999, Marker et al., 2005).

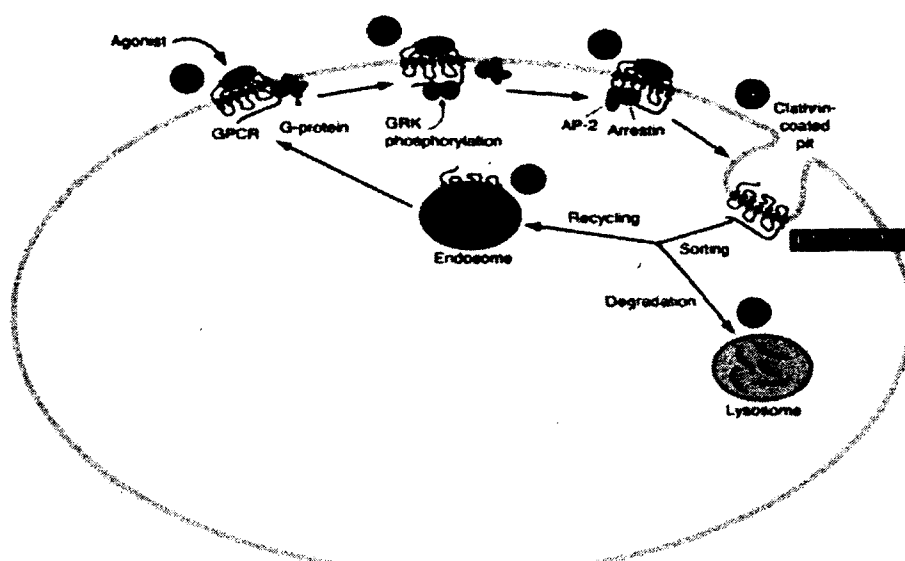


Figure 8 Mécanismes d'internalisation et de recyclage de DOPR (Tirée et adaptée de (Bie et Pan, 2007)). Suite à la liaison d'un agoniste sur le récepteur (1), ce dernier subit un changement de conformation permettant la phosphorylation de sa partie C-terminale par les GRK (2). Il s'ensuit une libération du complexe hétérotrimériques de protéines G et la liaison de protéine β -arrestine (3). Le récepteur est par la suite internalisé à l'aide de puits de clathrine (4). Il peut alors être dirigé vers des endosomes pour être recyclé à la membrane plasmique (5) ou dirigé vers les lysosomes pour être dégradé (6).

1.5 Adressage membranaire de DOPR et analgésie

1.5.1 Rôle du récepteur opioïdérique mu

Les propriétés analgésiques des agonistes DOPR sont faibles chez les animaux sains, mais elles peuvent être augmentées dans certaines conditions ou en réponse à certains stimuli. Plusieurs études ont été réalisées sur le rôle potentiel de MOPR dans l'analgésie induite par les agonistes DOPR. Chez les rongeurs, un traitement de 48 heures avec des doses croissantes de morphine permet une augmentation du nombre de DOPR associés à la membrane plasmique de neurones de la corne dorsale de la moelle épinière (Cahill et al., 2001b, Morinville et al., 2003, 2004a) et des DRG (Gendron et al., 2006). Des études de microscopie électronique ont en effet montrées une mobilisation de DOPR de compartiments intracellulaires vers la membrane plasmique suite au traitement à la morphine (Cahill et al., 2001b, Morinville et al., 2003, Gendron et al., 2006). L'utilisation du ligand fluorescent ω -Bodipy red-[D-Ala²]-deltorpin I est une autre technique donnant

un indice sur la densité membranaire de DOPR (Figure 9). Le ligand fluorescent étant internalisé par le récepteur, les niveaux de fluorescence intracellulaire sont donc le reflet du nombre de récepteurs disponibles à la membrane plasmique. À l'aide de cette technique, il a été montré qu'un traitement avec la morphine permet une augmentation de la densité membranaire de DOPR dans les neurones de la moelle épinière (Morinville et al., 2004a) ainsi que dans les neurones de DRG (Gendron et al., 2006). L'augmentation membranaire de DOPR dans les DRG est observée dans les neurones de toutes les tailles (petit, moyen et large diamètre) (Gendron et al., 2006). Ces modifications dans la localisation cellulaire de DOPR sont principalement dues à un trafic accru du récepteur vers la membrane et non à une augmentation des niveaux d'ARNm ou de la synthèse protéique de DOPR (Cahill et al., 2001b, Morinville et al., 2004a, Gendron et al., 2006).

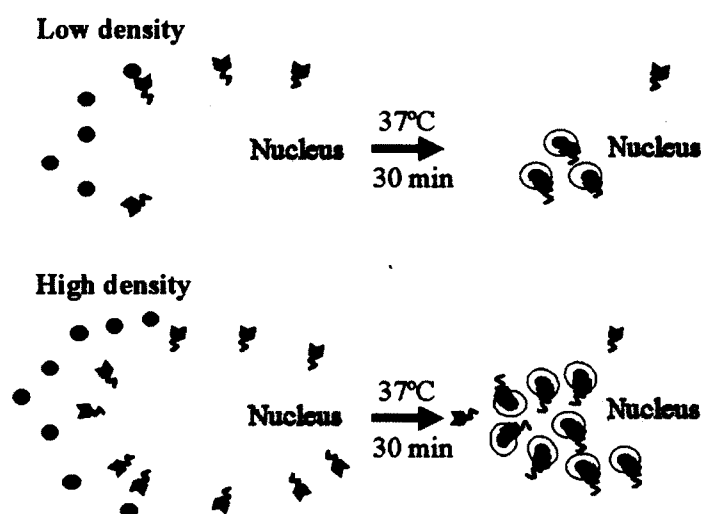


Figure 9 Représentation schématique de l'essai d'internalisation d'un récepteur induit par un ligand fluorescent. (Tirée de (Cahill et al., 2001b)). Cet essai est utilisé pour donner un indice de la densité membranaire d'un récepteur. Lorsqu'il y a peu de récepteur situé au niveau membranaire, seulement une faible quantité de ligand fluorescent peut s'y lier. Il en résulte donc une faible internalisation du complexe ligand-récepteur. D'un autre côté, lorsqu'on retrouve une quantité importante de récepteur au niveau membranaire, une plus grande quantité de ligand fluorescent peut alors lier un récepteur. Il en résulte alors une importante internalisation du complexe ligand-récepteur. Dans cet essai, les niveaux d'internalisation du ligand fluorescent peuvent donc donner un indice de la densité membranaire du récepteur ciblé.

L'augmentation du nombre de récepteurs disponibles à la membrane plasmique s'accompagne aussi d'un accroissement des propriétés analgésiques des agonistes DOPR. En effet, des injections intrathécales de deltorphine II, un agoniste sélectif DOPR, sont plus efficaces suite à un traitement à la morphine pour soulager la douleur thermique et chimique (Cahill et al., 2001b, Morinville et al., 2003). L'action de la morphine sur DOPR dans ce modèle a été vérifiée à l'aide de souris déficiente en MOPR (MOPR^{-/-}). Chez ces souris, il n'y a aucune différence dans la localisation de DOPR ou dans la quantité de DOPR présent dans les neurones au niveau basal (avant traitement). Cependant, l'absence de MOPR chez les souris traitées à la morphine empêche la mobilisation de DOPR vers la membrane plasmique (Morinville et al., 2003). Un traitement de 48 heures avec d'autres agonistes agissant sur MOPR (méthadone, étorphine, fentanyl) a aussi mené à des effets analgésiques accrus des agonistes DOPR (Morinville et al., 2003). Par contre, un traitement trop prolongé avec la morphine (plus de 48 heures) peut amener une tolérance des effets analgésiques des agonistes DOPR chez les rongeurs (Pradhan et al., 2006, Gendron et al., 2007a).

La modification des effets analgésiques ainsi que la mobilisation de DOPR a aussi été observée dans d'autres régions où l'on retrouve les récepteurs DOPR et MOPR. En effet, suite au traitement avec un agoniste MOPR, une augmentation membranaire de DOPR est observée dans les neurones du noyau accumbens et du neostriatum, mais pas dans les neurones du cortex préfrontal (Lucido et al., 2005). Les effets d'un traitement répété avec des agonistes MOPR semblent donc être restreints à certaines régions du système nerveux. L'augmentation de la compétence fonctionnelle de DOPR suite à un traitement avec des agonistes MOPR a aussi été montrée dans les neurones du noyau raphé magnus (NRM), de la PAG et de l'amygdale. Dans ces neurones, suite à un traitement à la morphine, un agoniste DOPR permet une inhibition importante de courants ioniques GABAergiques (Hack et al., 2005, Ma et al., 2006, Bie et al., 2010) et potassiques (GIRK) (Chieng et Christie, 2009), ce qui n'est pas le cas dans des conditions normales. Cet effet est indépendant d'une modification des valeurs de protéine kinase A (PKA) alors qu'elle dépend de la présence de MOPR ainsi que de la β -arrestine 2 (Hack et al., 2005). La localisation membranaire de DOPR est aussi dépendante des fibres afférentes (Morinville et al., 2004a). En effet, suite à une rhizotomie au niveau de la

partie dorsale de la moelle épinière lombaire de rat, les effets de la morphine sur la localisation de DOPR sont perdus. L'intégrité des fibres semble donc importante pour permettre l'augmentation des compétences fonctionnelles de DOPR.

1.5.2 Rôle du récepteur opioïdergique kappa

Le rôle de KOPR a aussi été étudié dans la régulation de DOPR. Un traitement chronique de 7 jours avec le (-)U-50,488H, un agoniste sélectif de KOPR, double les propriétés antinociceptives des agonistes sélectifs DOPR (Khotib et al., 2004). Cette même étude a montré que l'accroissement de l'analgésie était corrélé avec une plus grande capacité de liaison des agonistes DOPR au niveau du thalamus. Donc, l'activation chronique de KOPR semble aussi favoriser une augmentation de l'analgésie produite par les agonistes DOPR, possiblement via une augmentation des niveaux membranaires du récepteur, du moins dans le thalamus.

1.5.3 Modèle de douleur inflammatoire

Comme mentionné précédemment, chez les rongeurs sains les agonistes sélectifs de DOPR ont peu d'effets analgésiques, possiblement dû à une faible disponibilité membranaire de DOPR. Certains modèles animaux de douleur peuvent cependant permettre une augmentation de l'analgésie des agonistes DOPR comme c'est le cas dans des modèles de douleur inflammatoire. Une injection unilatérale de carragénine ou d'adjuvant complet de Freund (CFA) dans une patte arrière de rongeur induit de l'œdème et de l'hyperalgésie locale débutant dans les heures suivant l'injection (Stein et al., 1988).

Dans un modèle de douleur inflammatoire induite par le CFA, une injection intrathécale de deltorphine II 72 heures post-CFA produit des effets antihyperalgésiques importants (Cahill et al., 2003, Gendron et al., 2007b). En effet, en utilisant le test plantaire (Hargreaves test; en réponse à un stimulus thermique), la deltorphine II atteint son pic maximal d'analgésie environ 15 minutes suivant l'injection d'agoniste, et ce pour la patte en inflammation. Des effets analgésiques ont aussi été observés avec des agonistes DOPR injectés de façon intrathécale pour une douleur inflammatoire de plus

courte durée (3 heures et 24 heures) (Hylden et al., 1991, Stewart et Hammond, 1994, Qiu et al., 2000). Des injections d'agonistes sélectifs DOPR au niveau intracérébroventriculaire (i.c.v.) (Fraser et al., 2000), dans la RVM (Hurley et Hammond, 2000), de façon orale (Petrillo et al., 2003) et subplantaire (Hervera et al., 2009, Leanez et al., 2009) ont aussi montrées des effets antihyperalgésique dans des modèles de douleur inflammatoire.

En plus de cette augmentation des propriétés analgésiques des agonistes DOPR, une modification de la localisation cellulaire des récepteurs a été observée. Avec des études de microscopie électronique au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière, il a été montré que 72 heures suite à l'injection de CFA, une plus grande densité de DOPR se retrouvait associée ou à proximité de la membrane plasmique du côté ipsilatéral (Cahill et al., 2003, Morinville et al., 2004b). Cet effet démontre une mobilisation de DOPR des compartiments intracellulaires vers la membrane plasmique. Au niveau des neurones de DRG, une augmentation membranaire de DOPR a aussi été démontrée à l'aide de la deltorphine fluorescente dans les neurones de petit et moyen diamètre seulement (Gendron et al., 2006). Cette augmentation de la localisation membranaire de DOPR ne semble pas être due à la synthèse de nouveaux récepteurs, étant donné que les niveaux d'ARNm de DOPR ne sont pas modifiés 72 heures post-CFA dans la moelle épinière ainsi que dans les DRG (Gendron et al., 2006, 2007a).

Étant donné le rôle connu de MOPR dans la régulation de DOPR suite à un traitement avec la morphine, des études ont été réalisées chez des souris MOPR^{-/-}. Dans le modèle CFA, l'analgésie induite par les agonistes DOPR est grandement diminuée en absence de MOPR (Gendron et al., 2007b). De plus, des études de microscopie électronique au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière montrent une absence de variation dans la localisation cellulaire de DOPR chez ces souris (Morinville et al., 2004b). En effet, l'absence de MOPR semble inhiber le trafic de DOPR vers la membrane plasmique observé suite à l'injection de CFA. Le récepteur mu semble donc jouer au rôle essentiel dans le trafic et l'analgésie induite par des agonistes DOPR en condition de douleur inflammatoire. Étant donné les effets positifs sur le trafic et l'analgésie DOPR d'un traitement morphine ainsi que ceux d'une douleur inflammatoire de type CFA, une étude a vérifiée l'impact de traiter à la morphine des rats en condition

de douleur inflammatoire induite par le CFA (Gendron et al., 2007a). Chez les rats en condition CFA/Morphine on note une augmentation de l'efficacité antihyperalgésique de la deltorphine II dans le traitement de l'hyperalgésie thermique. Cependant, aucune modification de la densité membranaire de DOPR n'est observée entre les rats sauvages et ceux en condition CFA/Morphine avec l'utilisation de l'agoniste DOPR fluorescent. Cette absence de modification de densité membranaire est corrélée avec une absence d'effets antinociceptifs des agonistes DOPR dans le test d'immersion de la queue dans l'eau chaude (*tail flick test*). Il semble donc y avoir une dichotomie dans les mécanismes cellulaires qui gèrent les effets antinociceptifs et antihyperalgésiques de la deltorphine II chez les rats en condition CFA/Morphine.

1.5.4 Modèle de douleur neuropathique

Un autre type de douleur chronique est la douleur neuropathique. On parle de douleur neuropathique lorsque le système nerveux, central ou périphérique, subit une lésion ou une atteinte. Des modèles de constriction (Desmeules et al., 1993, Holdridge et Cahill, 2007, Kabli et Cahill, 2007, Hervera et al., 2010) ou de ligature (Nichols et al., 1995, Hao et al., 1998a, Mika et al., 2001, Petrillo et al., 2003) de nerfs périphériques mènent à de l'allodynie (mécanique, thermique et face au froid) et à de l'hyperalgésie (thermique et face au froid) au niveau de la patte ipsilatérale. L'allodynie mécanique présente dans ces modèles peut être renversée de façon dose-dépendante suite à l'injection d'agonistes DOPR au niveau spinal (Nichols et al., 1995, Hao et al., 1998a, Mika et al., 2001, Holdridge et Cahill, 2007) ou périphérique (Desmeules et al., 1993, Kabli et Cahill, 2007, Hervera et al., 2010). L'hyperalgésie thermique ou l'allodynie face au froid peut aussi être renversée avec des agonistes DOPR. Une augmentation de l'efficacité antinociceptives des agonistes DOPR est aussi observée dans les modèles de douleur neuropathique (Hao et al., 1998a, Mika et al., 2001, Kabli et Cahill, 2007).

Suite à une douleur d'ordre neuropathique chez les animaux, les niveaux protéiques et d'ARNm de DOPR peuvent varier selon les études. En effet, des études ont montrées soit une augmentation des niveaux protéiques de DOPR et du marquage du récepteur dans les neurones DRG (Kabli et Cahill, 2007), ou aucune variation des

niveaux protéiques (Holdridge et Cahill, 2007) et d'ARNm dans la moelle (Hervera et al., 2010). Aussi, certaines études semblent montrer une diminution de marquage de DOPR dans la moelle épinière (Stone et al., 2004), des niveaux d'ARNm dans les DRG (Hervera et al., 2010) ainsi qu'une diminution de la capacité de liaison des agonistes DOPR au niveau de la moelle épinière (Besse et al., 1992) suite au développement d'une douleur neuropathique. Ces variations d'expression de DOPR peuvent être difficiles à réconcilier. Néanmoins, des souris DOPR^{-/-} présentent des réponses douloureuses accrues face à différents stimuli dans un modèle de douleur neuropathique (Nadal et al., 2006). Les peptides endogènes de DOPR jouent aussi un rôle important au niveau spinal dans le développement de ces modèles (Hao et al., 1998b). Le récepteur delta semble donc participer activement au contrôle de la douleur dans les modèles neuropathiques. L'augmentation des propriétés analgésiques des agonistes DOPR dans ces modèles pourrait possiblement être due à une modification du trafic du récepteur comme c'est le cas dans des modèles de douleur inflammatoire. Contrairement aux autres conditions résumées dans le tableau 1, l'adressage membranaire de DOPR n'a pas été vérifié dans les neurones de la moelle épinière et des DRG dans les modèles de douleur neuropathique.

	↗	↗	↗	↗
	↗	↗	↗	↔
	↔	ND	ND	ND
	↔	ND	ND	ND
	↔	ND	ND	ND
	ND	ND	ND	ND
	ND	↗	↔	↔

Tableau 1 Changements dans l'adressage membranaire de DOPR observés *in vivo*. Différentes conditions ont été utilisées dans la littérature pour observer l'adressage membranaire de DOPR dans les neurones de la moelle épinière ou des DRG. Le tableau suivant résume les effets obtenus chez les rongeurs. La flèche vers le haut indique une augmentation de la densité membranaire de DOPR dans les neurones. La flèche horizontale indique qu'il n'y a aucune modification dans la densité membranaire de DOPR. ND : Non-déterminés, ces effets n'ont pas été évalués.

1.5.5 Voie constitutive et voie régulée des RCPG

La localisation préférentiellement intracellulaire de DOPR est inhabituelle pour un RCPG. En effet, la majorité des RCPGs, une fois synthétisés, vont être dirigés vers la membrane plasmique. Cependant, certains RCPG (DOPR, NTS2, SST₅, 5-HT₇, 5-HT_{5A}, 5-HT_{1D}) (Stroh et al., 2000, Potrebic et al., 2003, Doly et al., 2004, 2005, Perron et al., 2006) sont peu localisés au niveau membranaire, mais plutôt retrouvés au niveau intracellulaire. Le récepteur DOPR est une protéine qui est initialement synthétisée et assemblée sous sa forme immature dans le réticulum endoplasmique (RE). La protéine nouvellement repliée migre alors vers l'appareil de Golgi où elle reçoit diverses modifications post-traductionnelles de façon à former un récepteur mature. Il existe au moins trois trajets possibles pour un RCPG nouvellement synthétisé à sa sortie du réseau trans-golgi (TGN) : 1) emprunter la voie de sécrétion constitutive, 2) emprunter la voie de

sécrétion régulée ou 3) emprunter la voie de dégradation lysosomale (Figure 10) (Griffiths et Simons, 1986, Rothman et Orci, 1992). La voie de sécrétion constitutive permet d'exporter les RCPGs vers la membrane plasmique via des vésicules de sécrétions immédiatement après sa sortie du TGN, c'est la voie privilégiée par une majorité de RCPG. La voie de sécrétion régulée va plutôt permettre l'insertion des RCPGs dans des vésicules de sécrétion qui vont rester au niveau intracellulaire en attente d'un signal leur permettant d'être dirigés vers la membrane plasmique. La voie de dégradation lysosomale va, quant à elle, conduire les RCPGs vers les lysosomes, des organelles qui vont permettre la dégradation du récepteur.

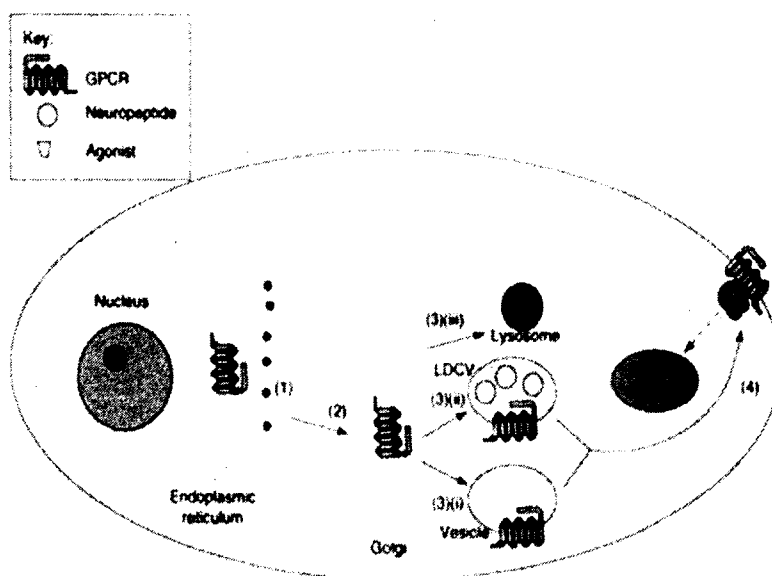


Figure 10 Voies de sécrétion empruntées par les RCPGs (Tirée et adaptée de (Cahill et al., 2007)). La protéine native est synthétisée et assemblée dans le RE (1). La protéine repliée migre alors vers le complexe Golgi (2) où elle subit des modifications post-traductionnelles pour former un récepteur mature. Suite à sa maturation, le RCPG est dirigé vers des vésicules cytosoliques pour être transporté par la voie constitutive (3)(i) ou régulée (3)(ii) jusqu'à la membrane plasmique. Il peut aussi être dirigé vers la voie des lysosomes (3)(iii) pour y être dégradé. Les vésicules de la voie régulée sont les LDCV qui contiennent divers neuropeptides. Les LDCV et les vésicules de la voie constitutive sont transportées jusqu'à la membrane plasmique, où elles relâchent leur contenu par exocytose et permettent l'insertion à la membrane des RCPGs qui y sont associés (4).

Le récepteur delta semblerait donc favoriser la voie de sécrétion régulée au dépend de la voie constitutive. Cela pourrait expliquer sa localisation majoritairement intracellulaire. Les principales vésicules de sécrétion de la voie régulée sont les LDCV. Ces vésicules contiennent plusieurs neuropeptides comme, entre autres, la substance P, le CGRP, la somatostatine et le BDNF (Merighi et al., 1988, Salio et al., 2007). La possible localisation de DOPR en association avec ces vésicules est controversée. En effet, plusieurs études montrent une localisation importante de DOPR dans ces vésicules (Cheng et al., 1995, 1997, Zhang et al., 1998, Bao et al., 2003, Guan et al., 2005), tandis que dans certaines études DOPR n'est que très rarement retrouvé dans les LDCV (Cahill et al., 2001a, Gendron et al., 2006, Scherrer et al., 2009).

1.5.6 Stimuli permettant la relâche de neuropeptides

L'hypothèse que l'exocytose des LDCV et la relâche de leur contenu en neuropeptides peut être couplé à une augmentation de la densité membranaire de DOPR a été proposée. Une augmentation de Ca^{2+} intracellulaire est responsable de la relâche de neurotransmetteurs compris dans les LDCV et pourrait, par la même occasion, être à l'origine de l'augmentation des niveaux membranaires de DOPR (Figure 11). Différents stimuli pouvant permettre la relâche de neuropeptides ont donc été évalués dans la régulation de DOPR (Figure 12).

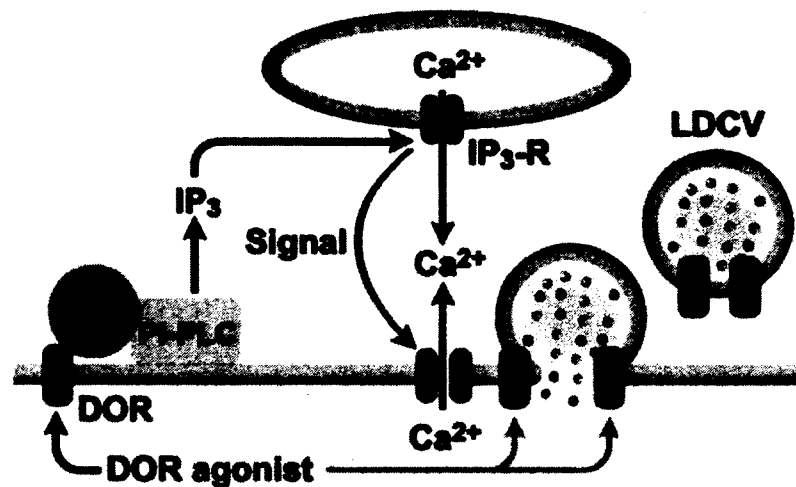


Figure 11 Modèle de relâche de neuropeptides par LDCV et insertion membranaire de DOPR (Tirée de (Bao et al., 2003)). Selon ce modèle, une augmentation des niveaux de calcium intracellulaire (par exemple suite à l'activation du récepteur DOPR) favorise le trafic des LDCV vers la membrane plasmique. La fusion des vésicules LDCV avec la membrane plasmique permet la relâche des neuropeptides et l'insertion de DOPR à la membrane plasmique.

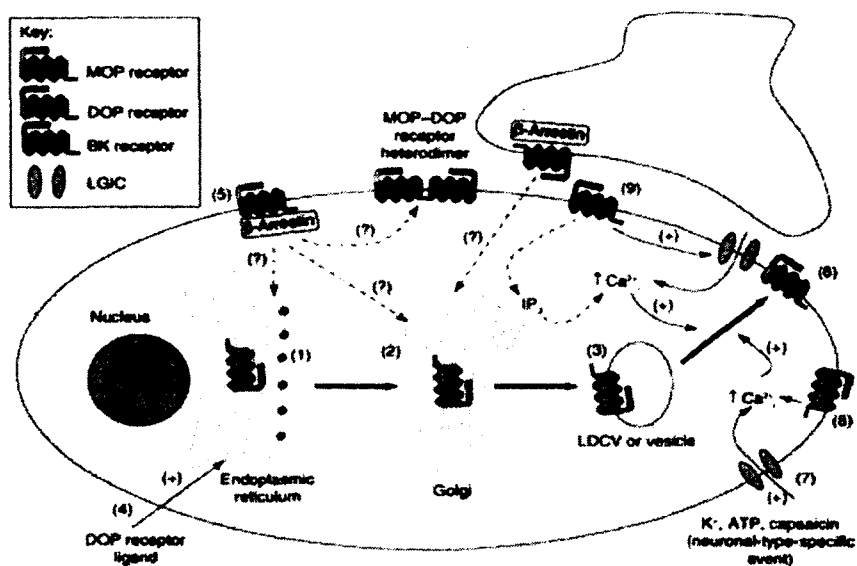


Figure 12 Stimuli connus pour augmenter la densité membranaire de DOPR (Tirée de (Cahill et al., 2007)). Les récepteurs delta sont transportés du RE des neurones (1) au niveau du Golgi (2) avant d'être inséré dans des vésicules (3) pour un transport constitutif ou régulé à la membrane plasmique. La maturation du récepteur peut être favorisée à l'aide de ligand soluble pour DOPR qui vont agir comme chaperonne pharmacologique avec le récepteur (4). Un traitement avec la morphine permet aussi l'augmentation du trafic de DOPR vers la membrane plasmique via l'activation de MOPR et le recrutement de protéines β -arrestine (5). La formation d'hétérodimères MOPR-DOPR est une des hypothèses avancées pour expliquer l'augmentation de DOPR membranaire suite à l'activation de MOPR. Les récepteurs delta matures sont stockés dans des vésicules comme les LDCV (3), maintenus au niveau intracellulaire et transportés via la voie régulée. Les récepteurs sont transportés et insérés à la membrane plasmique via exocytose (6). L'insertion de DOPR au niveau membranaire peut être induite par une augmentation de calcium intracellulaire produite par l'application de stimuli extracellulaires tels qu'une concentration élevée en potassium, l'ATP ou la capsaïcine (7). La stimulation de DOPR par des agonistes sélectifs (8) produit aussi une augmentation de calcium intracellulaire pouvant mener à une augmentation de l'adressage membranaire de DOPR. L'activation du récepteur à la bradykinine (9) cause aussi une augmentation du trafic de DOPR vers la membrane plasmique via une augmentation des niveaux de calcium intracellulaire.

1.5.6.1 Capsaïcine

La capsaïcine est un agoniste des récepteurs vanilloïdes de type 1 (TRPV1). Ce récepteur canal participe à la transmission du signal nociceptif au niveau des afférences primaires, en périphérie (Caterina et al., 1997, Guo et al., 1999, Michael et Priestley, 1999, Amaya et al., 2003). Les récepteurs TRPV1 sont principalement localisés sur des neurones de DRG de petit diamètre et leur activation permet une augmentation des niveaux de Ca^{2+} intracellulaire (Caterina et al., 1997). Des études ont donc évaluées le rôle possible de la capsaïcine dans la régulation de DOPR. Dans des petits neurones de DRG mis en culture, un traitement avec la capsaïcine permet une augmentation rapide de Ca^{2+} intracellulaire ainsi qu'une augmentation du nombre de récepteurs DOPR localisés à la surface membranaire des neurones (Bao et al., 2003, Guan et al., 2005). Des études avec un ligand fluorescent (Fluo-Deltorphine) ont aussi été réalisées et démontrent une plus grande densité membranaire de DOPR dans les petits neurones de DRG suite à une injection de capsaïcine dans la patte d'un rat (Gendron et al., 2006). Cet effet n'est pas observé dans les autres types de neurones, vraisemblablement dû à l'absence de TRPV1 dans ces neurones.

1.5.6.2 Récepteurs purinergiques

L'adénosine triphosphate (ATP) joue plusieurs rôles importants au niveau intracellulaire et extracellulaire. Un des rôles au niveau extracellulaire est son implication dans l'inflammation périphérique suite à une blessure ou une lésion (Brake et al., 1996, Holzer et Granstein, 2004). L'ATP se lie à plusieurs récepteurs purinergiques, entre autres au récepteur P_2Y_1 au niveau des afférences primaires, et participe à la nociception (Brake et al., 1996). L'activation du récepteur P_2Y_1 permet une relâche de Ca^{2+} intracellulaire et participe à la relâche de neuroptides contenus dans les LDCV (Nakatsuka et al., 2001). L'activation du récepteur P_2Y_1 a donc été évaluée dans la régulation de DOPR. Un traitement des petits neurones de DRG *in vitro* avec un agoniste du récepteur P_2Y_1 permet une augmentation du nombre de DOPR au niveau de la membrane plasmique, comme observé avec la capsaïcine (Bao et al., 2003).

1.5.6.3 Dépolarisation membranaire

La dépolarisation des neurones est aussi connue comme pouvant augmenter les niveaux intracellulaires de calcium et la relâche de neuropeptides (Huang et Neher, 1996). Un traitement avec une concentration élevée de potassium (K^+ ; 40 mM) a donc été utilisé pour étudier la mobilisation de DOPR dans les petits neurones de DRG. La dépolarisation induite par le traitement au potassium permet un recrutement de DOPR près de la membrane plasmique (Bao et al., 2003). Cependant, l'augmentation du nombre de DOPR membranaire n'indique pas si ces récepteurs sont fonctionnels. Une dépolarisation rapide avec un traitement au potassium des neurones de la PAG ne permet pas une augmentation de la fonctionnalité de DOPR (Hack et al., 2005) Tandis que des études de microscopie électronique n'ont pu confirmer une augmentation de la densité membranaire de DOPR suite à un traitement au KCl (Gendron et al., 2006).

1.5.6.4 Bradykinine

La bradykinine est un médiateur de l'inflammation agissant principalement sur le récepteur B_2 (Calixto et al., 2000). La bradykinine et les prostaglandines, comme PGE₂, permettent la relâche du neuropeptide CGRP et l'activation de l'adénylate cyclase, ce qui produit une accumulation d'AMPc. De façon basale, les agonistes DOPR ne peuvent inhiber cette relâche de CGRP et cette accumulation d'AMPc. Cependant, suite à un traitement des neurones avec la bradykinine, les agonistes DOPR peuvent alors inhiber la relâche de CGRP et diminuer l'accumulation d'AMPc (Patwardhan et al., 2005). Cette augmentation de la compétence fonctionnelle de DOPR est aussi corrélée à une augmentation du trafic du récepteur vers la membrane plasmique des neurones (Patwardhan et al., 2005). L'augmentation de l'adressage membranaire de DOPR se fait de façon indépendante de la protéine kinase C (PKC), et est possiblement due à une modification des taux de calcium intracellulaire (Patwardhan et al., 2005). Cependant, l'activation du récepteur B_2 par la bradykinine mène à l'activation de la PKC. L'augmentation de la compétence fonctionnelle de DOPR, en comparaison avec l'augmentation membranaire du récepteur, est quant à elle dépendante de la PKC. Donc, l'activation du récepteur B_2 semble être essentielle pour permettre la compétence

fonctionnelle de DOPR, tandis que les modifications des niveaux de calcium intracellulaire suite à un traitement avec un médiateur de l'inflammation semblent être responsables du trafic du récepteur.

L'implication des médiateurs de l'inflammation dans la régulation de DOPR a aussi été étudiée en conditions *in vivo*. Dans un modèle d'allodynie thermique induite par l'injection de prostaglandine PGE2, les agonistes DOPR injectés en périphérie ne peuvent renverser les effets allodyniques (Rowan et al., 2009). Cependant, si un prétraitement avec la bradykinine ou l'acide arachidonique (un médiateur de l'inflammation) est effectué, les agonistes DOPR peuvent alors renverser l'allodynie induite par la PGE2 (Rowan et al., 2009). De façon intéressante, l'augmentation de la compétence de DOPR suite au traitement avec la bradykinine ou l'acide arachidonique est aussi dépendante de la PKC comme c'était le cas dans les tests *in vitro*.

1.5.6.5 Protéases

Les protéases comme la trypsine ou la tryptase participent au développement de la douleur inflammatoire (Steinhoff et al., 2000, Hoogerwerf et al., 2001). Plus précisément, ces effets semblent être induit par l'activation du récepteur des protéases activées, comme le PAR-2 (Steinhoff et al., 2000, Hoogerwerf et al., 2001). Dans les neurones des ganglions trigéminaux (TG) *in vitro*, l'activation de PAR-2 permet la relâche de CGRP, l'accumulation d'AMPc et participe donc à la nociception. Tout comme avec la bradykinine, un traitement des neurones du TG avec des agonistes de PAR-2 permet une augmentation de la compétence fonctionnelle de DOPR dans ces neurones (Patwardhan et al., 2006).

1.5.6.6 Facteur de croissance neuronal

Dans les neurones de DRG, le NGF est principalement présent dans les neurones de type peptidergiques (Averill et al., 1995). Il joue un rôle important dans la croissance et la différenciation des neurones tout en participant à l'inflammation et à la nociception via son action sur le récepteur TrkA (McMahon, 1996, Sofroniew et al., 2001). Un

traitement avec le NGF a été étudié pour vérifier l'implication du NGF sur le trafic de DOPR. Dans un modèle *in vitro*, le NGF induit une augmentation de l'ARNm de DOPR via une activation de la voie PI3K/AKT, suite à l'activation de son récepteur TrkA (Chen et al., 2006). On note aussi une mobilisation de DOPR au niveau intracellulaire. En effet, la signalisation via le récepteur TrkA permet un mouvement de DOPR nouvellement synthétisés vers un pool intracellulaire de récepteurs (Kim et von Zastrow, 2003). Ce pool de récepteurs intracellulaires peut par la suite être transporté jusqu'à la membrane plasmique suite à une dépolarisation membranaire. Chez des animaux traités de façon chronique avec du NGF, une augmentation de la fonctionnalité de DOPR est aussi observée (Bie et al., 2010). En effet, comme il avait été observé avec un traitement chronique avec la morphine (Ma et al., 2006), un traitement prolongé au NGF semble augmenter la compétence fonctionnelle du récepteur DOPR dans les neurones glutamatergiques du noyau raphé magnus (NRM). Cette augmentation est possiblement due à une augmentation du nombre de récepteurs disponible au niveau membranaire.

1.5.6.7 Test de nage forcée

De l'analgésie peut être observée en réponse à un stress. Dépendamment du type de stress, l'analgésie se fera via différentes voies endogènes (Terman et al., 1984). Selon certaines études, un stress de nage forcée dans l'eau froide, à raison de 3 minutes dans l'eau maintenue à 4°C semble induire de l'analgésie via les opioïdes endogènes (Vanderah et al., 1992, Mizoguchi et al., 1995). Dans ces conditions, le trafic de DOPR peut être affecté dans des neurones de la PAG ventrolatérale. Des études de microscopie électronique ont en effet montrées que, suite au stress, on observe une augmentation du nombre de DOPR associés avec la membrane plasmique (Commons, 2003). De plus, dans cette étude, la plupart des DOPR sont associés avec des LDCV. Dans les neurones de la PAG ventrolatérale, ces récepteurs semblent donc être mobilisés vers la membrane plasmique en réponse à un stress de nage forcée dans l'eau froide.

1.5.6.8 Rôle des agonistes du récepteur opioïdergique delta

Les agonistes DOPR jouent aussi un rôle dans la régulation de leur propre récepteur. L'utilisation d'agonistes DOPR, en plus de permettre l'analgésie, permet une augmentation du nombre de récepteurs au niveau membranaire (Bao et al., 2003, Guan et al., 2005). En effet, dans des petits neurones de DRG en culture, l'ajout de deltorphine permet une augmentation du trafic de DOPR vers la membrane plasmique. Ce trafic accru du récepteur serait possiblement dû à un recrutement de DOPR associés avec les LCDV (Bao et al., 2003).

1.6 Mécanismes potentiels de régulation de l'adressage de DOPR

1.6.1 Problème de maturation du récepteur

Les mécanismes responsables de la localisation majoritairement intracellulaire du récepteur ainsi que ceux qui régissent son trafic en réponse à divers stimuli restent controversés. En effet, plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer ces phénomènes. Une de ces hypothèses est que DOPR serait peu localisé au niveau membranaire en raison de problèmes de maturation lors de sa synthèse. Lors des étapes de synthèse, maturation et migration de la protéine DOPR, le passage au niveau du RE semble jouer un rôle important dans l'expression membranaire du récepteur. En effet, c'est à ce niveau que les protéines se replient de façon à acquérir leurs conformations tridimensionnelles et subissent leurs premières modifications (clivage, glycosylation, palmitoylation, etc.). Elles sont par la suite exportées vers l'appareil de Golgi où elles atteignent leur forme mature, puis finalement vers la membrane plasmique. Pour ce qui est de DOPR, il a été montré dans des cellules HEK293 (*human embryonic kidney* 293) que seulement 40% des protéines synthétisées au niveau du RE peuvent atteindre la membrane plasmique (Petaja-Repo et al., 2000). En effet, la majorité des DOPR restent sous leur forme de précurseur immature au niveau du RE et ne peuvent atteindre l'appareil de Golgi.

Au niveau du RE, on retrouve un contrôle de qualité qui permet la rétention de protéines dont le repliement est incomplet ou incorrect et qui permet leur dégradation si

les problèmes de conformation persistent (Ellgaard et Helenius, 2003). Différentes modifications sont effectuées au niveau des protéines pour leur permettre de passer le contrôle de qualité et d'être exportées vers l'appareil de Golgi. Comme pour la plupart des protéines, les intermédiaires incomplets ou mal repliés de DOPR sont exportés du RE, subissent des ubiquitinations et sont dégradés par le protéasome (Petaja-Repo et al., 2001). Pour favoriser la maturation, le repliement adéquat et le transport à la membrane, la protéine native DOPR subit diverses palmitoylations (Petaja-Repo et al., 2006) et glycosylations en N-terminal (Markkanen et Petaja-Repo, 2008). Ces étapes favorisent donc son passage au niveau du contrôle de qualité et limitent ainsi la quantité de récepteurs dégradés. Diverses protéines interviennent dans cette étape, dont la calnexine qui retient les protéines inadéquatement repliées, aide à leur repliement et les conduit à leur dégradation lorsque nécessaire (Ellgaard et Helenius, 2003). Cette protéine chaperonne ainsi qu'une pompe calcique de la membrane du RE, la SERCA2b (*Sarco(endo)plasmic reticulum calcium ATPase*) interagissent avec DOPR ce qui favorise sa maturation et son repliement (Tuusa et al., 2007) (Tuusa et al., 2010). Cependant, l'interaction avec la calnexine peut aussi mener à la dégradation de DOPR (Markkanen et Petaja-Repo, 2008). Le contrôle de qualité du RE semble donc jouer un rôle important dans la migration de DOPR. (Petaja-Repo et al., 2001).

D'autres études ont été réalisées dans le but de mieux comprendre le rôle du contrôle de qualité dans le faible taux d'exportation des récepteurs à la membrane cellulaire. Des ligands sélectifs pour DOPR qui peuvent traverser la membrane cellulaire (i.e. liposoluble) agissent comme chaperonnes pharmacologiques en stabilisant la forme native ou intermédiaire de la protéine au niveau du RE (Petaja-Repo et al., 2002). Cela favorise le repliement adéquat de DOPR et augmente ainsi son transport à la membrane. Il semble donc que ce soit des intermédiaires incomplets de la protéine DOPR qui sont retenus au niveau du RE et dégradés, plutôt que des protéines DOPR avec un repliement inadéquat. L'action des ligands liposolubles favorise aussi la dissociation de la protéine avec la calnexine, empêchant ainsi DOPR d'être dégradé avant d'avoir atteint la conformation désirée (Leskela et al., 2007). Les récepteurs delta semblent donc être des protéines qui, au niveau du RE, présentent une cinétique de repliement lente, ce qui mène à leur exclusion prématurée par le contrôle de qualité du RE sous une forme incomplète.

Ils sont par la suite dégradés par le protéasome, ce qui expliquerait la faible portion de récepteurs correctement repliés quittant le RE et atteignant la membrane plasmique sous une forme mature.

1.6.2 Hétérodimères MOPR-DOPR

La co-expression possible entre DOPR et MOPR évoque la possibilité de rôles communs pour ces récepteurs. De plus, l'importance de MOPR dans la régulation de l'adressage membranaire de DOPR suite à un traitement chronique à la morphine ou dans un modèle de douleur inflammatoire suggère une implication directe entre les récepteurs, possiblement importante pour la régulation de DOPR. Plusieurs RCPGs peuvent interagir entre eux pour former des dimères fonctionnels (George et al., 2002, Terrillon et Bouvier, 2004, Bulenger et al., 2005, Rozenfeld et Devi, 2010). Le récepteur delta peut former des homodimères fonctionnels qui peuvent lier sans problèmes les agonistes DOPR (Cvejic et Devi, 1997, McVey et al., 2001, Filizola et al., 2002). Il peut aussi former des hétérodimères avec différents autres RCPGs, tels que KOPR (Jordan et Devi, 1999, Wang et al., 2005), le récepteur aux chimiokines CXCR4 (Pello et al., 2008) et le récepteur β 2-adrénergique (Jordan et al., 2001, McVey et al., 2001).

Plusieurs études ont évaluées la formation possible d'hétéromères MOPR-DOPR. Des études de co-immunoprécipitation (Gomes et al., 2000, McVey et al., 2001, Fan et al., 2005, Law et al., 2005) et de BRET (transfert d'énergie entre molécules bioluminescentes) (McVey et al., 2001, Gomes et al., 2004, Wang et al., 2005, Hasbi et al., 2007) ont toutes confirmées la proximité de MOPR et DOPR dans des cellules transfectées avec les deux récepteurs. En fait, MOPR et DOPR se retrouveraient à moins de 100 Å l'un de l'autre dans ces cellules, ce qui représente une distance assez courte pour permettre une interaction directe (Gomes et al., 2004). En comparaison avec les récepteurs opioïdiques retrouvés sous forme de monomères, les hétérodimères présentent des propriétés différentes. Des études ont en effet montrées des modifications dans les propriétés de liaison des agonistes sélectifs MOPR et DOPR (George et al., 2000, Gomes et al., 2000, 2004, Fan et al., 2005, Hasbi et al., 2007, Kabli et al., 2010) ainsi que dans les voies de signalisation empruntées (George et al., 2000, Charles et al.,

2003, Fan et al., 2005, Hasbi et al., 2007, Rozenfeld et Devi, 2007, Kabli et al., 2010) suite à la formation d'hétérodimères. Les hétérodimères MOPR-DOPR pourraient être formés au niveau du réticulum endoplasmique (RE) (Fan et al., 2005, Hasbi et al., 2007, Decaillot et al., 2008) ou encore formés directement à la surface membranaire (Law et al., 2005). Les divergences au niveau de ces études peuvent être attribuées aux différents modèles cellulaires étudiés. Cependant, il semblerait que les hétérodimères soient majoritairement formés au niveau du RE et que cette étape soit importante pour passer le contrôle de qualité (Bulenger et al., 2005). Par contre, toutes ces études ont été réalisées avec des cellules transfectées donc de façon *in vitro*, ce qui ne reflète pas nécessairement ce qui se produit au niveau endogène.

Pour permettre la formation d'hétérodimères, la co-expression de MOPR et DOPR dans les mêmes cellules est évidemment essentielle. Comme mentionné précédemment, l'expression de MOPR et DOPR dans les mêmes neurones est controversée. Dernièrement, des anticorps sélectifs pour l'hétérodimère MOPR-DOPR ont été synthétisés (Gupta et al., 2010). À l'aide de ce nouvel outil, la présence d'hétérodimères MOPR-DOPR a été montrée chez les rongeurs dans les neurones de DRG ainsi que dans différentes zones du cerveau (cortex, RVM, noyau médial du corps trapézoïde (MNTB), hypothalamus, noyau accumbens, aire tegmentale ventrale). De plus, l'impact d'un traitement chronique de 48 heures à la morphine a été évalué. Au niveau des neurones de DRG et de certaines zones du cerveau mentionnées ci-haut, on retrouve une plus grande quantité d'hétérodimères MOPR-DOPR suite à ce traitement (Gupta et al., 2010). Un traitement chronique à la morphine semble donc augmenter la formation d'hétérodimères MOPR-DOPR. Ainsi, cette augmentation d'hétérodimères pourrait être un mécanisme responsable de l'augmentation de DOPR au niveau membranaire.

1.6.3 Protéines chaperonnes

Le trafic intracellulaire des RCPGs, que ce soit pour l'adressage membranaire, ou le devenir du récepteur suite à son internalisation, est étroitement régulé. En effet, les différents comportements observés chez les récepteurs pourraient, pour la plupart, être

attribués à leurs interactions avec différentes protéines au niveau intracellulaire. Pour DOPR, quelques protéines semblent jouer un rôle de chaperonne dans sa régulation.

1.6.3.1 RTP-4

Une des protéines identifiées pour le récepteur DOPR est la protéine RTP-4, un membre de la famille des protéines de transport du récepteur. Un rôle pour cette protéine dans la régulation de deux autres RCPGs a déjà été montré. En effet, une interaction avec les récepteurs odorants (ORs) et des récepteurs du goût (TAS2Rs) a déjà été montrée et RTP-4 favorise leur exportation vers la surface cellulaire (Saito et al., 2004, Behrens et al., 2006). Au niveau des récepteurs opioïdiques, la protéine RTP-4 jouerait un rôle dans la régulation de l'hétérodimère MOPR-DOPR. Les hétérodimères formés dans le RE sont retenus dans l'appareil de Golgi (Decaillot et al., 2008). L'interaction avec DOPR bloquerait un signal de MOPR important pour son transport constitutif vers la membrane plasmique. La protéine RTP-4 se lierait aux récepteurs, les protégeant contre l'ubiquitination et la dégradation. Cela favoriserait ainsi leur sortie de l'appareil de Golgi et permettrait aux hétérodimères d'être envoyés vers la membrane plasmique (Decaillot et al., 2008). La protéine RTP-4 semble donc jouer un rôle de protéine chaperonne favorisant la dimérisation des RCPGs et leur exportation vers la membrane plasmique.

1.6.3.2 NHERF-1

La protéine NHERF-1 (facteurs de régulation de l'échangeur Na^+/H^+) est une protéine adaptatrice présente au niveau intracellulaire qui peut se lier à certains RCPGs (Brady et Limbird, 2002, Weinman et al., 2006, Hanyaloglu et von Zastrow, 2008). Elle est impliquée dans la régulation du récepteur β 2-adrénergique (Hall et al., 1998, Cao et al., 1999) et de KOPR (Li et al., 2002). Suite à l'internalisation du récepteur, elle s'y lie et favorise la voie de recyclage vers la membrane plasmique au détriment de la voie de dégradation par les lysosomes. Par contre, une interaction très faible, voire quasi nulle, entre NHERF-1 et DOPR a été observée, ce qui pourrait expliquer la dégradation majoritaire de DOPR (Heydorn et al., 2004, Huang et al., 2004). Ces observations ont

cependant été réalisées sur des cellules naïves n'ayant reçu aucune stimulation. Suite à un traitement chronique à la morphine ou au NGF, une augmentation de l'interaction entre DOPR et NHERF-1 est observée (Bie et al., 2010). Cette interaction semble essentielle pour maintenir l'augmentation de la fonctionnalité de DOPR observée suite à ces traitements.

1.6.3.3 GASP

Dans l'étude de protéines pouvant être impliquées dans la régulation de DOPR, une protéine cytoplasmique pouvant lier la queue C-terminale du récepteur a été découverte (Whistler et al., 2002, Heydorn et al., 2004). Cette protéine chaperonne, nommée GASP (protéine de triage associée aux RCPGs), fait partie d'une famille de protéines qui interagissent avec des RCPGs et jouent un rôle dans leurs régulations post-endocytique (Simonin et al., 2004). La protéine GASP se lie à DOPR et favorise ainsi son trafic vers la voie de dégradation par les lysosomes (Whistler et al., 2002). Le signal reconnaissant GASP sur DOPR n'est pas retrouvé au niveau de MOPR, ce qui pourrait expliquer les différences de régulation entre ces récepteurs (Whistler et al., 2002). Suite à la liaison de GASP avec le récepteur internalisé, la dysbindine, une autre protéine cytoplasmique, s'associerait avec GASP et participerait aussi au trafic du récepteur vers les lysosomes (Marley et von Zastrow, 2010). La protéine GASP semble donc être une protéine chaperonne importante dans la régulation de DOPR suite à son internalisation.

1.7 Substance P

La substance P est un neuropeptide ayant plusieurs rôles dans l'organisme. Elle est entre autres impliquée dans la transmission nociceptive (Otsuka et Yoshioka, 1993). Une étude a démontré un rôle possible de la substance P dans la régulation de DOPR (Guan et al., 2005). En effet, le domaine du gène de la préprotachykinine A (PPTA) codant pour la substance P interagirait avec la troisième boucle extracellulaire de DOPR pour permettre la localisation du récepteur dans les LDCV (Figure 13). Dans les petits neurones de DRG, cette interaction serait essentielle pour permettre l'association de

DOPR avec les LDCV ainsi que pour son trafic vers la membrane plasmique en réponse à divers stimuli (Guan et al., 2005, Wang et al., 2010a). Une perte de l'efficacité analgésique des agonistes sélectifs DOPR est aussi observée chez les souris saines déficientes en PPTA ($PPTA^{-/-}$), et donc déficientes en substance P, en réponse à un stimulus thermique.

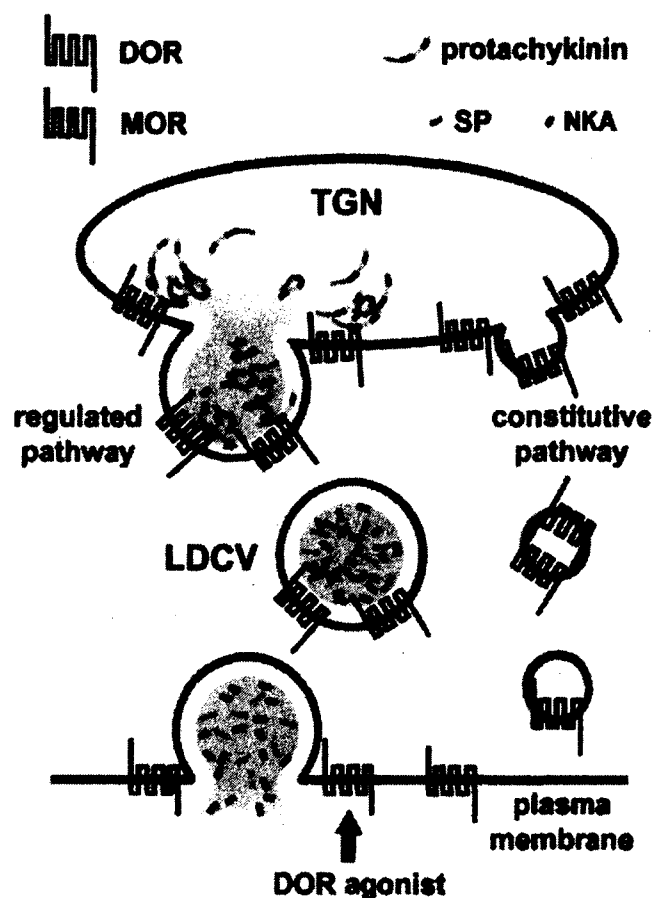


Figure 13 Modèle proposé pour le triage de DOPR dans la voie de sécrétion régulée (Tirée et adaptée de (Zhang et al., 2010)). Au niveau du réseau trans-Golgien (TGN), la protachykinine (précurseur de la substance P) est dirigée vers les LDCV. Le récepteur delta est aussi trié dans les LDCV via une interaction entre sa troisième boucle extracellulaire (en vert) et le domaine de la substance P de la protachykinine (en rouge). Durant le transport vers la membrane plasmique, la protachykinine produit des peptides matures (substance P (SP) et neurokinine A (NKA)) et se dissocie de DOPR. Les récepteurs delta seront insérés à la membrane plasmique lors de l'exocytose des LDCV en réponse à certains stimuli. Une certaine quantité de DOPR peuvent aussi être transportés via la voie de sécrétion constitutive, voie empruntée par MOR, et être insérés à la membrane de façon constitutive.

1.7.1 Fonction et localisation de la substance P

La substance P est un neuropeptide de la famille des tachykinines qui agit principalement comme neurotransmetteur dans la douleur (Otsuka et Yoshioka, 1993). La substance P est largement distribuée au niveau du système nerveux, mais on en retrouve aussi un peu partout dans l'organisme, entre autre au niveau de la vessie, de l'iléon, des glandes salivaires et du cœur (Otsuka et Yoshioka, 1993). Les premières hypothèses d'un rôle de neurotransmetteur pour la substance P ont été émises suite à sa localisation dans différentes zones du cerveau, dans la moelle épinière, dans les DRG et au niveau des fibres périphériques (Hokfelt et al., 1975b, a, Takahashi et Otsuka, 1975). Plus précisément, dans la moelle épinière la substance P a été majoritairement retrouvée au niveau de la corne dorsale, dans les laminae superficielles I-II (Hokfelt et al., 1975a, Pickel et al., 1977). L'implication de la substance P dans la transmission nociceptive a été confirmée face à divers stimuli nociceptifs (Laneuville et al., 1988). La substance P est aussi présente dans les neurones de DRG, majoritairement dans les fibres de petits diamètres, soit les fibres C de types peptidergiques (Hokfelt et al., 1975a, b, McCarthy et Lawson, 1989). De faibles quantités de substance P ont été détectées dans les neurones afférents A δ , tandis que l'on en détecte aucune dans les fibres non-nociceptives (A β) (McCarthy et Lawson, 1989). Dans les neurones, la substance P est retrouvée dans les LDCV (Pickel et al., 1977, Merighi et al., 1988). Elle peut être co-localisée dans ces vésicules avec d'autres peptides, tels que le CGRP, la somatostatine ou le BDNF (Merighi et al., 1988, Salio et al., 2007). Une séquence dans la protachykinine est détectée comme un signal de localisation pour les LDCV et la substance P y est dirigée (Ma et al., 2008). Le gène PPTA, code aussi pour d'autres tachykinines, comme la neurokinine A (NKA), aussi appelée substance K (Figure 14) (Nawa et al., 1983, 1984, Tatemoto et al., 1985, Kawaguchi et al., 1986, Kotani et al., 1986, Krause et al., 1987, Helke et al., 1990).

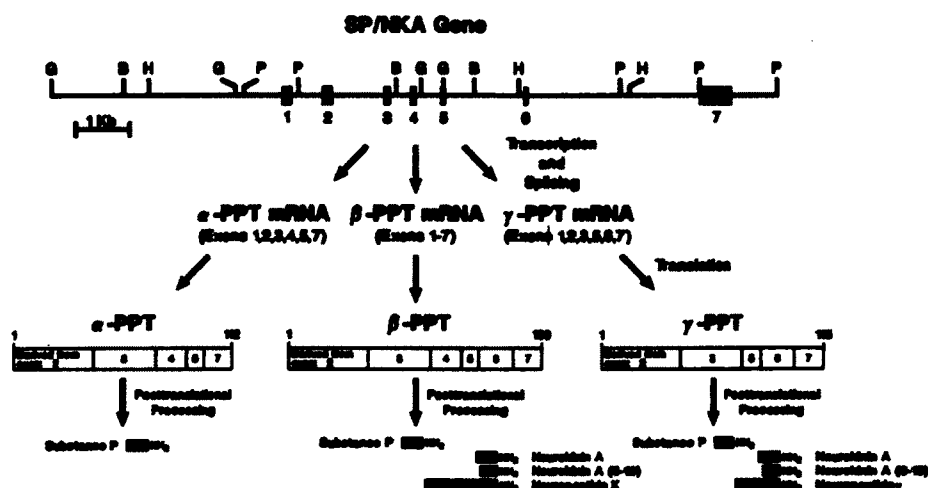


Figure 14 Structure du gène de la préprotachykinine A (PPTA) et des tachykinines (Tirée de (Helke et al., 1990)). Le gène de la PPTA est illustré dans le haut avec les différents exons numérotés de 1 à 7. Suite à la transcription et à l'épissage alternatif, les ARNm α-, β- et γ-PPT sont générés. Les ARNm sont par la suite traduits en séquences d'acides aminés correspondant. Finalement, suite à diverses transformations, les différents peptides sont générés. La substance P, est la tachykinine la plus connue et est obtenue à partir des trois précurseurs. Les différentes tachykinines produites à partir de ce gène sont la neurokinine A, le neuropeptide γ et le neuropeptide K.

1.7.2 Lien possible entre la substance P et le récepteur delta

L'interaction entre la substance P et DOPR est un sujet controversé. En effet, une étude récente a suggérée que la substance P et DOPR ne seraient pas co-exprimés dans les mêmes neurones, rendant impossible l'interaction physique proposée entre les deux (Scherrer et al., 2009). En utilisant des souris DOR^{EGFP}, aucune co-localisation n'est observée entre DOPR et la substance P tant au niveau de la moelle épinière que des afférences desservants la peau (Figure 15) (Scherrer et al., 2009). Cette observation remet donc en question l'interaction proposée entre le domaine de la substance P de PPTA et la troisième boucle extracellulaire de DOPR (Guan et al., 2005). De plus, dans leur modèle, Scherrer et *al.* remettent en question la régulation de DOPR en observant ce récepteur à la membrane de façon basale. Ils suggèrent donc que DOPR se comporte comme un RCPG normal en étant exprimé de façon constitutive à la membrane plasmique.

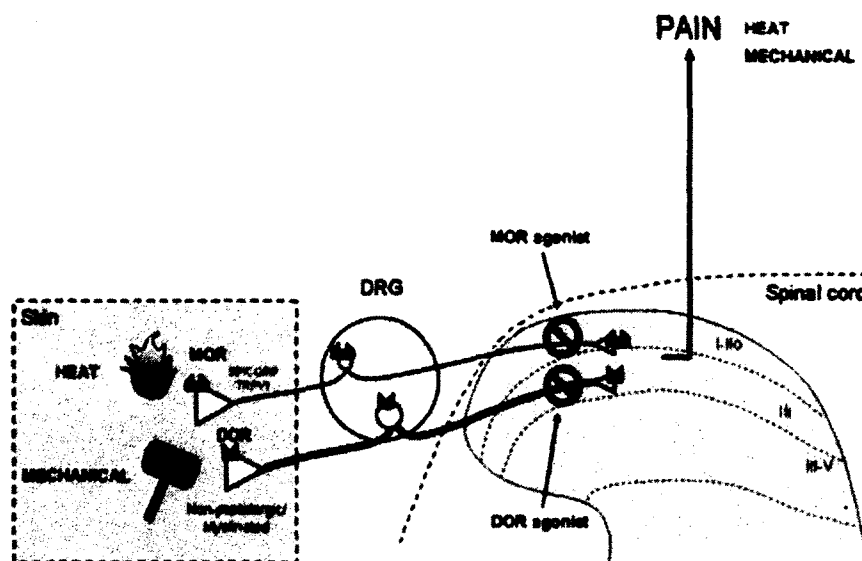


Figure 15 Localisation proposée des récepteurs opioïdiques dans les afférences primaires (Tirée et adaptée de (Scherrer et al., 2009)). Selon ce modèle, MOPR est exprimé par les neurones sensibles à la chaleur ($TRPV1^+$), peptidergiques (SP^+ et $CGRP^+$) et non-myélinisés qui innervent la peau. Le récepteur delta est quant à lui exprimé par les neurones myélinisés ainsi que les neurones non-peptidergiques et non-myélinisés qui sont sensibles aux stimuli mécaniques. Les neurones exprimant DOPR et MOPR projettent vers des lamina différentes dans la corne dorsale de la moelle épinière (lamina I-II externe et lamina II interne respectivement). Dû à cette ségrégation de l'expression des récepteurs dans les nocicepteurs, les agonistes DOPR diminueraient préférentiellement la douleur mécanique, tandis que les agonistes MOPR inhiberaient principalement la douleur thermique.

2. Objectifs du Projet

L'interaction proposée entre le récepteur opioïdergique delta (DOPR) et la substance P dans la régulation du récepteur est un sujet controversé. Inévitablement, pour permettre une interaction, DOPR et la substance P doivent être localisés dans les mêmes cellules. Certaines données remettent en doute l'expression de DOPR dans les neurones des ganglions rachidiens (DRG) de petit diamètre exprimant la substance P. Néanmoins, si une interaction entre DOPR et la substance P est effectivement possible et essentielle pour la régulation du récepteur dans ces neurones, le patron de distribution de DOPR dans les neurones de DRG est toutefois différent de celui de la substance P. Le récepteur delta, contrairement à la substance P, est en effet retrouvé dans les neurones de DRG de tous les diamètres. De plus, une augmentation sélective de la densité membranaire de DOPR est observée suite à un traitement à la morphine ou dans un modèle de douleur inflammatoire induite par l'adjuvant complet de Freund (CFA). En effet, un traitement à la morphine permet une augmentation des niveaux membranaire de DOPR dans les petits, moyens et larges neurones de DRG, tandis qu'une douleur inflammatoire permet une augmentation sélective de DOPR dans les neurones de DRG de petits et moyens diamètres. Étant donné la faible présence ou l'absence de substance P dans certaines de ces populations de neurones, un mécanisme alternatif de régulation de DOPR doit exister. Ainsi, l'augmentation de l'efficacité analgésique des agonistes DOPR observée suite à l'augmentation de la densité membranaire de DOPR pourrait être due à différents mécanismes de régulation.

L'objectif principal de cette étude était donc d'évaluer les propriétés analgésiques d'un agoniste sélectif pour DOPR, la deltorphine II, dans un modèle de douleur inflammatoire induite par le CFA chez des souris invalidée pour la substance P. Pour ce faire, des souris PPTA^{-/-} ont été utilisées. Dans un modèle de douleur inflammatoire induite par le CFA les effets antihyperalgésiques de la deltorphine II ont été évalués en réponse à un stimulus nociceptif thermique. De plus, des études de microscopie électronique ont été conduites avec les moelles épinières de souris traitées CFA, déficientes ou non en PPTA, pour évaluer l'impact de l'absence de la substance P sur la

localisation de DOPR. Finalement, les effets antinociceptifs de la deltorphine II en réponse à un stimulus thermique ont été évalués chez ces souris.

3 Article

Delta opioid receptor-mediated analgesia is not altered in preprotachykinin A knockout mice

Auteurs de l'article : Dave Dubois et Louis Gendron

Statut de l'article : Publié

European Journal of Neuroscience, Décembre 2010 Volume 32, Issue 11, pages 1921-1929, 2010

Avant-propos :

J'ai pleinement contribué à la rédaction de cet article. En effet, j'ai participé à la rédaction de chacune des sections de cet article. De plus, j'ai réalisé toutes les expérimentations présentées ici, tant l'implantation de la colonie de souris, que les tests comportementaux et immunohistochimiques.

Résumé

Il a déjà été montré que l'analgésie produite par des agonistes du récepteur opioïdérique delta (DOPR) était augmentée dans un modèle de douleur inflammatoire induite par l'adjuvant complet de Freund (CFA). Cet effet serait possiblement dû à une augmentation du transport de DOPR vers la membrane plasmique des neurones de ganglions rachidiens (DRG) et de la moelle épinière. Parmi les mécanismes potentiels de régulation de l'adressage membranaire de DOPR, une interaction avec la substance P dans les vésicules à corps dense a été décrite comme étant un mécanisme essentiel pour le trafic approprié de DOPR vers la membrane plasmique. Le récepteur delta est retrouvé dans les neurones de DRG de petits, moyens et larges diamètres et les niveaux de DOPR associés à la membrane plasmique peuvent être augmentés sélectivement dans les petits et moyens neurones de DRG dans un modèle de douleur inflammatoire induite par le CFA. Étant donné la localisation majoritaire de la substance P dans les neurones de petits diamètres, nous avons émis l'hypothèse que la substance P ne serait pas impliquée dans tous les mécanismes de régulation de DOPR, particulièrement dans les neurones n'exprimant pas de substance P. En utilisant des souris déficientes pour le préprotachykinine A (précurseur de la substance P; PPTA^{-/-}), nous avons premièrement confirmé que ces souris n'exprimaient pas de substance P et possédaient des niveaux d'inflammation induite par le CFA semblable aux souris sauvages. Par la suite, en utilisant le test plantaire (test de Hargreaves), nous avons montré qu'une injection intrathécale de deltorphine II induisait des effets antihyperalgésiques semblables chez les souris PPTA^{-/-} et sauvages. En utilisant le test d'immersion de la queue dans l'eau chaude nous avons aussi observé des effets antinociceptifs de la deltorphine II comparable chez les souris PPTA^{-/-} et sauvages. Nos résultats suggèrent que la substance P ne serait pas impliquée dans tous les mécanismes de régulation de DOPR, spécialement dans un modèle de douleur inflammatoire induite par le CFA.

Abstract:

We have shown that delta opioid receptor (DOPR)-mediated analgesia was enhanced in the complete Freund's adjuvant (CFA) model of inflammation. This effect is thought to originate from translocation of DOPR in the plasma membrane of dorsal root ganglia (DRG) and spinal cord neurons. Among the putative mechanisms involved in the regulation of DOPR trafficking, an interaction with substance P (SP) in large dense core vesicles has been described as an essential event for externalization of DOPR. Since we have previously observed that membrane DOPRs were upregulated in small- and medium-sized neurons under inflammatory pain conditions (while SP is mainly expressed by small DRG neurons) we raised the hypothesis that a SP-independent mechanism mediates DOPR trafficking and functional emergence in the CFA model. Therefore, we investigated the role of SP in DOPR-mediated analgesia by using preprotachykinin A (precursor of SP) knockout mice (PPTA^{-/-}) in the CFA model of inflammation. First, we confirmed that PPTA^{-/-} mice are not expressing SP and have similar level of CFA-induced inflammation than wildtype mice. Then, using the thermal plantar test, we found that an intrathecal injection of deltorphin II induced DOPR-mediated antihyperalgesia, which was not modified by the absence of SP (similar efficacy and potency in wildtype and PPTA^{-/-} mice). We also observed comparable analgesia of intrathecal deltorphin II for PPTA^{-/-} and wildtype mice in the hot water immersion tail flick test. Consequently, our results suggest that SP is not essential for membrane insertion and for the functional emergence of DOPR.

Introduction:

Delta opioid receptor (DOPR)-selective agonists have been reported to induce fewer side-effects than the commonly used mu opioid receptor (MOPR) agonists (Porreca *et al.*, 1984; May *et al.*, 1989; Szeto *et al.*, 1999; Brandt *et al.*, 2001; Petrillo *et al.*, 2003; Gallantine & Meert, 2005). It was therefore proposed that these compounds could represent an interesting alternative for the treatment of chronic pain (Mika *et al.*, 2001; Cahill *et al.*, 2003).

In normal animals, DOPR-selective agonists only produced limited analgesia (reviewed in Cahill *et al.*, 2007) probably because DOPRs are mostly expressed in intracellular compartments (Cheng *et al.*, 1995, 1997; Elde *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 1998; Cahill *et al.*, 2001a). However, various studies have revealed that DOPR-mediated analgesia can be improved following repeated treatments with MOPR agonists (Cahill *et al.*, 2001b; Morinville *et al.*, 2003; Hack *et al.*, 2005). DOPR agonists are also more effective under inflammatory (Stewart & Hammond, 1994; Fraser *et al.*, 2000; Hurley & Hammond, 2000; Cahill *et al.*, 2003; Petrillo *et al.*, 2003; Morinville *et al.*, 2004b; Gendron *et al.*, 2007a, b) and neuropathic pain conditions (Mika *et al.*, 2001; Petrillo *et al.*, 2003; Holdridge & Cahill, 2007). This enhanced analgesic efficacy of DOPR agonists was found to be paralleled by an increase in membrane-associated DOPRs in spinal cord and dorsal root ganglia (DRG) neurons (Cahill *et al.*, 2001b, 2003; Morinville *et al.*, 2003, 2004a, b; Gendron *et al.*, 2006). Interestingly, following treatment with MOPR agonists this increase in the level of DOPRs associated with neuronal plasma membranes was observed in all three sizes (small, medium, and large) of DRG neurons whereas inflammation induced by complete Freund's adjuvant (CFA) results in membrane recruitment of DOPRs specifically in small- and medium-sized DRG neurons (Gendron *et al.*, 2006). Among the mechanisms for DOPR trafficking, a role for substance P (SP) has been described where the SP domain of preprotachykinin A (PPTA) acts as a "peptide courier for DOPR" (Guan *et al.*, 2005).

In large dense-core vesicles, the SP domain of PPTA was shown to interact with the third extracellular loop of DOPR (Guan *et al.*, 2005). This physical interaction was

thought to be required for DOPRs to reach the plasma membrane through the regulated secretory pathway and is a necessary factor for DOPRs to mediate analgesia (Guan *et al.*, 2005). Because DOPRs are expressed in all types of DRG neurons (Wang & Wessendorf, 2001) and SP is predominantly expressed in small DRG neurons (McCarthy & Lawson, 1989), we formed the hypothesis that SP is not involved in all of the regulated mechanisms of DOPR trafficking, especially in the subset of DRG neurons which do not express SP. In the present study, we used the CFA model of inflammation to determine the role, if any, of SP in enhanced DOPR-mediated analgesia. Substance P-deficient mice (PPTA^{-/-} mice) and their wildtype littermates were used in two different pain paradigms (thermal plantar and hot water immersion tail flick tests) to assess the analgesic effect of intrathecal deltorphin II, a DOPR-selective agonist.

Experimental Procedures:

Animals

Experiments were performed in adult male C57BL/6 mice (10-16 weeks old; 24-30g). Homozygous male preprotachykinin A (PPTA) knockout (-/-, $Tac1^{Tm1Bbm}$, Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA) and wildtype female (+/+, Charles River, St-Constant, QC, Canada) mice were used to establish the colony. An F1 generation of heterozygous (+/-) mice was used to produce F2 PPTA^{-/-} and PPTA^{+/+} littermates used for our experiments. The mice were genotyped using DNA extracted from tail samples at two weeks of age. The PPTA^{-/-} mice were viable, fertile and did not show any unusual behavior. The mice were housed in groups of two to four and maintained on a 14 h light/dark cycle (light period = 06:00-20:00). Food and water were available *ad libitum*. The experiments were approved by the local animal care committee at Université de Sherbrooke (Protocol #080-06) and adhered to the Canadian Council on Animal Care guidelines on the ethical use of animals and the guidelines from the International Association for the Study of Pain (IASP). All experiments were designed to minimize the number of animals used and their suffering. Each animal participated in only one experiment, and then it was euthanized.

Induction of inflammation

Unilateral inflammation was induced as previously described (Gendron *et al.*, 2007b). Fifty microliters of complete Freund's adjuvant (CFA; Calbiochem, San Diego, CA, USA) in a 1:1 saline emulsion was injected subcutaneously in the plantar surface of the right hind limb of mice under brief isoflurane anesthesia (3%, 2 mL/min). Behavioral testing was carried out 72 h after the CFA was injected.

Drugs

[D-Ala2]-Deltorphan II (lots #077K14561, Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada; # M08048T1, American Peptide, Sunnyvale, CA, USA; #5/20720, Tocris, Ballwin, MO, USA), a DOPR-selective agonist, was dissolved in sterile saline

(0.9% NaCl) at 1 mg/mL and stored at -20°C in aliquots until use. For behavioral testing, deltorphin II was diluted in a sterile saline solution to a final concentration of 1-5 µg/5 µL and injected intrathecally in mice. Naltrindole hydrochloride (lot #12A/103955, Tocris Bioscience, Ellisville, Missouri, USA), a DOPR-selective antagonist, was dissolved in DMSO at 100 mM and stored at -20°C in aliquots until use. For behavioral testing, naltrindole was diluted in a sterile saline solution to a final concentration of 5 nmol/5 µL and injected intrathecally in mice. Final concentration of DMSO in this solution was 1%. Intrathecal injections were performed in non-anesthetized mice as described previously (Fairbanks, 2003; Gendron *et al.*, 2007b). Briefly, a 30G ½ needle mounted on a 10 µL Luer-tip Hamilton syringe was inserted into the L5-L6 intervertebral space and a 5 µL volume of deltorphin II was injected. Saline was used as a vehicle control. Appropriate placement of the needle was confirmed by the observation of a light flick of the tail. Also, as described before, intrathecal injection of deltorphin II in mice resulted in motor uncoordination and ataxia-like behavior restricted to the hind limbs and Straub tail symptoms in mice (Gendron *et al.*, 2007b; Beaudry *et al.*, 2009). Note that these effects did not interfere with the ability of mice to respond to painful stimuli (Gendron *et al.*, 2007b).

Immunohistochemistry

Immunohistochemistry was carried out to observe the presence of substance P in the spinal cords of PPTA^{-/-} and PPTA^{+/+} mice. First, the animals were briefly anesthetized with 5% isoflurane and perfusion-fixed with ice-cold 4% paraformaldehyde (PFA; Polysciences, Inc., Warrington, PA, USA). The spinal cord was removed by laminectomy, post-fixed in ice-cold 4% PFA for 1 h and cryoprotected in phosphate-buffered saline (PBS) containing 30% sucrose for three days. Following cryoprotection, the lumbar segment L4-L6 was snap-frozen in -50°C isopentane. Afterwards, transverse sections (35µm thick) were cut using a sliding microtome (Leica SM2000R; Toronto, Ontario, Canada) and placed in PBS buffer. Then the floating sections were incubated in 1% hydrogen peroxide in PBS for 20 min to remove endogenous peroxidase activity. Next, the slices were rinsed twice with PBS and incubated for 1 h at room temperature

(22°C) in a blocking solution containing 5% normal goat serum (NGS) and 0.3% Triton X-100 in PBS. After a brief washing step, the sections were incubated overnight at 4°C with a guinea pig anti-SP antibody diluted 1:500 in PBS (lot 293; Abcam Inc, Cambridge, MA, USA) containing 1% NGS and 0.1% Triton X-100. Then, the floating sections were washed two times in PBS and incubated with a biotinylated goat anti-guinea pig secondary antibody (lot S0111; Vector Laboratories, Burlington, Ontario, Canada) at 1:400 in PBS for 1 h followed by a 1 h incubation with avidin-biotin horseradish peroxidase complex (Vectastain ABC Elite Kit Standard; Vector Laboratories, Burlington, Ontario, Canada) at room temperature. After the final wash with PBS, the chromagen was developed using nickel-intensified 3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, 0.5mg/mL, lot 036K8208; Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada) and 0.0015% H₂O₂ for 90 s. The reaction was stopped using additional washes with PBS. The sections were mounted onto chrom-alum coated slides, dehydrated in a series of graded alcohols and defatted in a xylene substitute (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA). Slides were then coverslipped using Permount (Fisher Scientific Company, Toronto, Ontario, Canada). The slides were visualized using a Leica DM4000B microscope (Toronto, Ontario, Canada) equipped with a InfinityX camera (Lumenera Scientific, Ottawa, Ontario, Canada). The pictures were taken with a 20X objective using the same acquisition parameters and settings for all images.

Behavioral Testing:

Plethysmometer:

To evaluate the level of inflammation induced by CFA injection in PPTA^{-/-} and PPTA^{+/+} mice, the volume of the hind limbs was measured using a Plethysmometer (IITC Life Science Inc., Woodland Hills, CA, USA). The paw was placed in a small water bath, and the volume displacement was measured. Two measurements were carried out 72 h after CFA injection for both the ipsilateral (i.e. CFA-injected paw) and the contralateral paws. The data are expressed as the percentage (%) of paw volume relative to the total body weight of the animal.

Plantar test:

The development of hyperalgesia and the antihyperalgesic effects of deltorphin II in PPTA^{-/-} and PPTA^{+/+} mice were assessed using the plantar test (i.e. the response to noxious heat stimulus). To test for thermal withdrawal thresholds, the mice were placed in Plexiglas enclosures set on a glass surface (IITC Life Science Inc., Woodland Hills, CA, USA) for a 15 min habituation period, 48 h and 24 h prior to taking baseline measurements. The following day, the heat source was positioned under the plantar surface of the hind paw after a 15 min habituation period, and the latency to paw withdrawal in response to radiant heat was measured twice for each hind paw (corresponding to -72 h). Measurements were taken at least 5 min apart from each other. CFA was injected in the right hind paw as described above. Seventy-two hours after injecting CFA, baseline withdrawal latencies (identified as PostCFA or 0) were measured again prior to the intrathecal injections of drugs. Deltorphin II (0.25-2.5 µg) or saline were injected, afterwards, the latencies until paw withdrawal were recorded every 15 min over a period of 60 min. In some experiments, intrathecal naltrindole (5 nmol) was injected 15 min prior to deltorphin II injection. The intensity of the light beam was adjusted to 30%, which produced baseline latencies of approximately 10 s in naïve C57BL/6 mice. A cutoff time of 20 s was imposed to prevent tissue damage. If an animal reached the cutoff, the light beam was automatically turned off and the animal was assigned the maximum analgesia score. The percentage of the maximum antihyperalgesic effect (MPAHE) of deltorphin II and saline in CFA-injected mice was calculated for the inflamed hind paw according to the following formula: %MPAHE = 100 X [(test latency) – (baseline latency following CFA)] / [(baseline latency prior to CFA) – (baseline latency following CFA)]. From the latter calculation, a %MPAHE of 0% represents no antihyperalgesic effect, whereas a %MPAHE of 100% corresponds to the complete relief of hyperalgesia, i.e. a response latency to radiant heat which is identical to baseline prior to CFA. The experimenter was blind to the genotype during all testing.

Tail flick test:

To test for the antinociceptive effects of deltorphin, tail flick latencies were measured in naive PPTA^{-/-} and PPTA^{+/+} mice. Briefly, two centimeters of the tail was immersed in a water bath apparatus (IITC Life Science Inc., Woodland Hills, CA, USA) maintained at $52 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$. The latency to response was determined by a vigorous tail flick. Baseline measurements were taken three times for each mouse on the day of the experiment. Subsequently, the mice were injected intrathecally with deltorphin II (2.5-5 μg) or saline and the latencies were measured every 10 min for a 60 min period. A cutoff time of 10 s was imposed to avoid tissue damage. If an animal reached the cutoff, the tail was removed from water and the animal was assigned the maximum score. The percentage of the maximal possible effect (MPE) of deltorphin II was calculated according to the formula: $\% \text{MPE} = 100 \times [(\text{test latency}) - (\text{baseline latency})] / [(\text{cutoff time}) - (\text{baseline latency})]$. The experimenter was blind to the genotype during all testing.

Calculation and statistical analysis

Calculations were conducted using Excel 2007, the graphs were plotted with SigmaPlot 11.0, and the statistical analysis was performed with Graph Pad Prism 5.0. The data are expressed as the mean \pm S.E.M.

Results:

Characterization of PPTA^{+/+} and PPTA^{-/-} mice

Substance P-like immunoreactivity in the spinal cords of PPTA knockout and wildtype littermate mice

At the spinal cord level, substance P (SP) is known to be expressed in small peptidergic primary afferents which terminate in superficial lamina I and II (Hokfelt *et al.*, 1975). To confirm that PPTA knockout (PPTA^{-/-}) mice do not express SP, the mice were perfusion-fixed and their spinal cords were stained with an antibody directed against amino acids 1-11 of rat SP. As shown in Fig. 1A, SP-like immunoreactivity in the L5 lumbar spinal cord segment of PPTA wildtype littermates (PPTA^{+/+}) was mainly localized to superficial lamina I and II and the lateral spinal nucleus. As expected, SP-like immunoreactivity was completely lost in the spinal cord sections of PPTA^{-/-} animals (Fig. 1B). No residual staining was observed in superficial lamina I and II nor in the lateral spinal nucleus of PPTA^{-/-} mice. These observations agree with previous report in which the same strain of mice was used (Cao *et al.*, 1998).

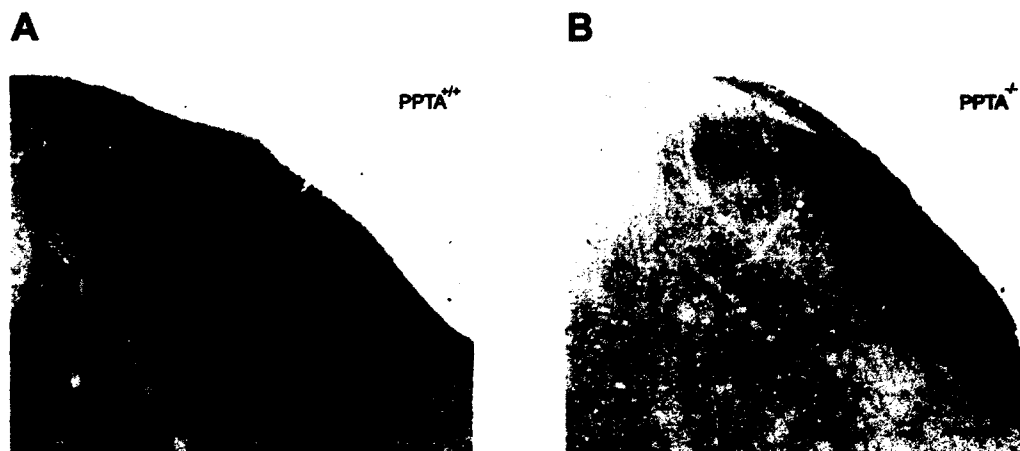


Figure 1 Characterization of PPTA^{-/-} and wildtype littermate mice. (A) Expression of SP in the L5 lumbar section of the spinal cord following DAB-amplification of SP-immunostaining. In PPTA^{+/+} mice, SP-like immunoreactivity can be clearly visualized in superficial lamina I and II and in the lateral spinal nucleus (scale bar = 0,15 mm). (B) In the PPTA^{-/-} mice, SP-like immunoreactivity in the L5 lumbar spinal cord section was completely eliminated.

CFA-induced inflammation in PPTA^{-/-} mice

Peripheral inflammation induced by complete Freund's adjuvant (CFA) was shown to be non-neurogenic, indicating that it is independent of primary afferent fiber activity (Hylden *et al.*, 1992). In other words, CFA-induced inflammation does not depend upon SP expression and release. In the present study, we measured the paw volume to confirm that the unilateral injection of CFA in the right hind paw produced similar inflammation in PPTA^{-/-} and wildtype littermates. As shown in Fig. 2, 72 h after CFA injection, the volume of the ipsilateral hind paw was significantly increased compared to the contralateral paw. Indeed, the mean volume of the ipsilateral paw was approximately two times the mean volume of the contralateral paw in wildtype littermates ($1.57 \pm 0.04\%$ and $0.72 \pm 0.02\%$ for the ipsi- and contralateral paws, respectively) and in PPTA^{-/-} mice ($1.57 \pm 0.04\%$ and $0.77 \pm 0.02\%$ for the ipsi- and contralateral paws, respectively; $P < 0.0001$, $F_{1,1} = 637.4$, two-way ANOVA followed by Bonferroni's post-hoc test). We also observed that CFA-induced inflammation was not significantly different between genotypes ($P = 0.4638$, $F_{1,1} = 0.5401$, two-way ANOVA followed by Bonferroni's post-hoc test). Therefore, we confirmed that expression of SP is not essential to induce inflammation and edema in the CFA model of inflammation.

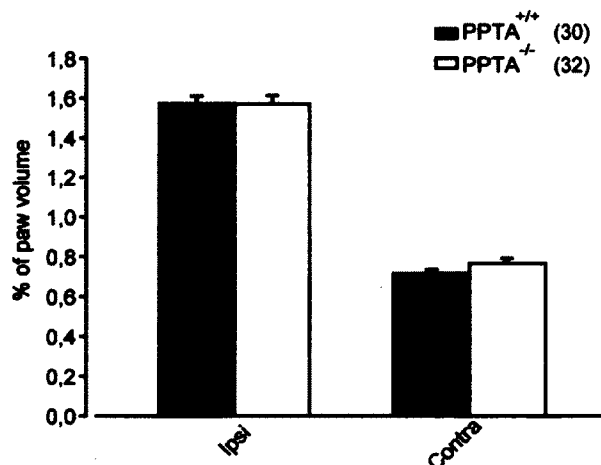


Figure 2 Level of edema seventy-two hours after CFA injection in the right hind paw (ipsilateral) in PPTA^{+/+} and PPTA^{-/-} mice. The edema of the inflamed paw was measured by water displacement and is expressed as the percentage (%) of paw volume relative to total body weight of the animal. No difference was observed in the level of inflammation induced by CFA (72 h after injection) between PPTA^{+/+} and PPTA^{-/-} mice.

Antihyperalgesic effect of deltorphin II in PPTA knockout and wildtype littermate mice

As shown in Fig. 3A, injection of deltorphin II, a delta opioid receptor (DOPR) selective agonist, (0.25-2.5 μg ; intrathecal) induced a dose-dependent inhibition of thermal hyperalgesia in the ipsilateral hind paw of PPTA wildtype mice. Similar to a previous study, the maximum effect of deltorphin II was reached 15 min after the injection (Gendron *et al.*, 2007b). The average baseline latency (i.e. before injection of CFA; -72 h) to paw withdrawal following a thermal stimulus was 9.70 ± 0.47 s. Seventy-two hours after CFA injection (corresponding to time 0), the latency to paw withdrawal was significantly reduced to 2.92 ± 0.15 s for the ipsilateral, inflamed paw. Intrathecal injection of 1 μg and 2.5 μg of deltorphin II induced antihyperalgesia, which peaked 15 minutes after the injection (reaching 9.84 ± 0.75 s and 12.02 ± 1.02 s) and returned to baseline after 45 to 60 min. Injecting 0.25 μg of deltorphin II produced no significant analgesia in these wildtype mice. At this dose, the paw withdrawal latency was 4.82 ± 0.7 s, 15 min after the deltorphin injection. Intrathecal injection of saline (5 μL) had no effect on the ipsilateral paw withdrawal latency.

To investigate whether SP was necessary for inflammation-induced functional emergence of DOPRs, the same experiments were performed in PPTA^{-/-} mice (Fig. 3B). As observed in PPTA^{+/+} mice, intrathecal injection of deltorphin II inhibited CFA-induced thermal hyperalgesia. In PPTA^{-/-} mice, deltorphin II injection (1 μg and 2.5 μg ; intrathecal) produced an antihyperalgesic effect which peaked 15 min post-injection and returned to baseline 45 to 60 min later. Similar to the wildtype littermates, injecting 0.25 μg of deltorphin II produced no significant analgesia. Intrathecal injection of saline (5 μL) had no effect on paw withdrawal latency.

From the data presented in Fig. 3A and 3B we then calculated the %MPAHE of deltorphin II at 15 min post-injection (Fig. 3C). For both genotypes, the calculated %MPAHE for saline (%MPAHE_{Saline} = $-3.01 \pm 3.69\%$ and $7.38 \pm 4.52\%$; respectively for PPTA^{+/+} and PPTA^{-/-}) and 0.25 μg of deltorphin II (%MPAHE_{0.25 μg} = $28.03 \pm 10.28\%$ for PPTA^{+/+}, $P > 0.05$, $F_{3,21} = 29.85$ vs. %MPAHE_{Saline}, and $17.39 \pm 6.97\%$ for PPTA^{-/-}; $P > 0.05$, $F_{3,23} = 39.81$ vs. %MPAHE_{Saline}, one-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test) indicated that these doses of deltorphin II were not sufficient to

produce analgesia. However, at 1 μg (%MPAHE_{1 μg} = $102.11 \pm 11.05\%$ and $129.19 \pm 11.46\%$; for PPTA^{+/+} and PPTA^{-/-}; $P < 0.001$ vs. %MPAHE_{Saline}, one-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test) and 2.5 μg (%MPAHE_{2.5 μg} = $134.13 \pm 15.01\%$ and $134.67 \pm 14.06\%$; for PPTA^{+/+} and PPTA^{-/-}; $P < 0.001$ vs. %MPAHE_{Saline}, a one-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test), intrathecal deltorphin II significantly relieved thermal hyperalgesia both in PPTA^{-/-} and wildtype littermate mice. Non-linear regressions were performed to evaluate the analgesic efficacy of deltorphin II in both genotypes. As illustrated in Fig. 3C, the dose-response curves of deltorphin II in PPTA^{+/+} and PPTA^{-/-} mice are not significantly different ($P = 0.3596$, $F_{3,36} = 1.105$ using an F-test). Indeed, we found that doses of $0.61 \pm 0.17 \mu\text{g}$ and $0.42 \pm 0.15 \mu\text{g}$ of deltorphin II were required to reach 50% of the maximal analgesia in PPTA^{+/+} and PPTA^{-/-} mice, respectively ($P = 0.4421$, $F_{1,36} = 0.6040$ using an F-test). Absence of significant differences in dose-response curves and ED₅₀ indicates that neither the efficacy nor the potency of deltorphin II to alleviate CFA-induced hyperalgesia were affected by the absence of substance P. As shown in Fig. 3D, intrathecal injection of naltrindole, a selective DOPR antagonist, was found to significantly block the antihyperalgesic effect of deltorphin II both in PPTA^{+/+} and PPTA^{-/-} mice ($P < 0.0001$, $F_{3,1} = 92.46$ using a two-way ANOVA followed by a Bonferroni's post-hoc test) indicating that the effect was DOPR-mediated.

Finally, the mean baseline prior to CFA injection (-72 h) was found to be similar in PPTA^{-/-} and PPTA^{+/+} mice ($P > 0.05$, $F_{3,1} = 36.83$ using a two-way ANOVA followed by a Bonferroni post-hoc test; Fig. 3E). CFA-induced hyperalgesia, as determined by the paw withdrawal latencies 72 h after CFA injection (time 0), was also similar between genotypes ($P > 0.05$, $F_{3,1} = 36.83$ using a two-way ANOVA followed by a Bonferroni post-hoc test; Fig. 3E). There was also no difference between the latency to paw withdrawal of the contralateral paw before and after the CFA for both genotypes ($P > 0.05$, $F_{3,1} = 36.83$ using a two-way ANOVA followed by a Bonferroni post-hoc test). As shown in Fig. 3F, intrathecal deltorphin II had no analgesic effect in the contralateral hind paw of PPTA^{+/+} and PPTA^{-/-} mice at the doses used in these experiments compared to i.t. saline ($P > 0.05$, $F_{3,1} = 2,153$ using a two-way ANOVA followed by a Bonferroni post-hoc test).

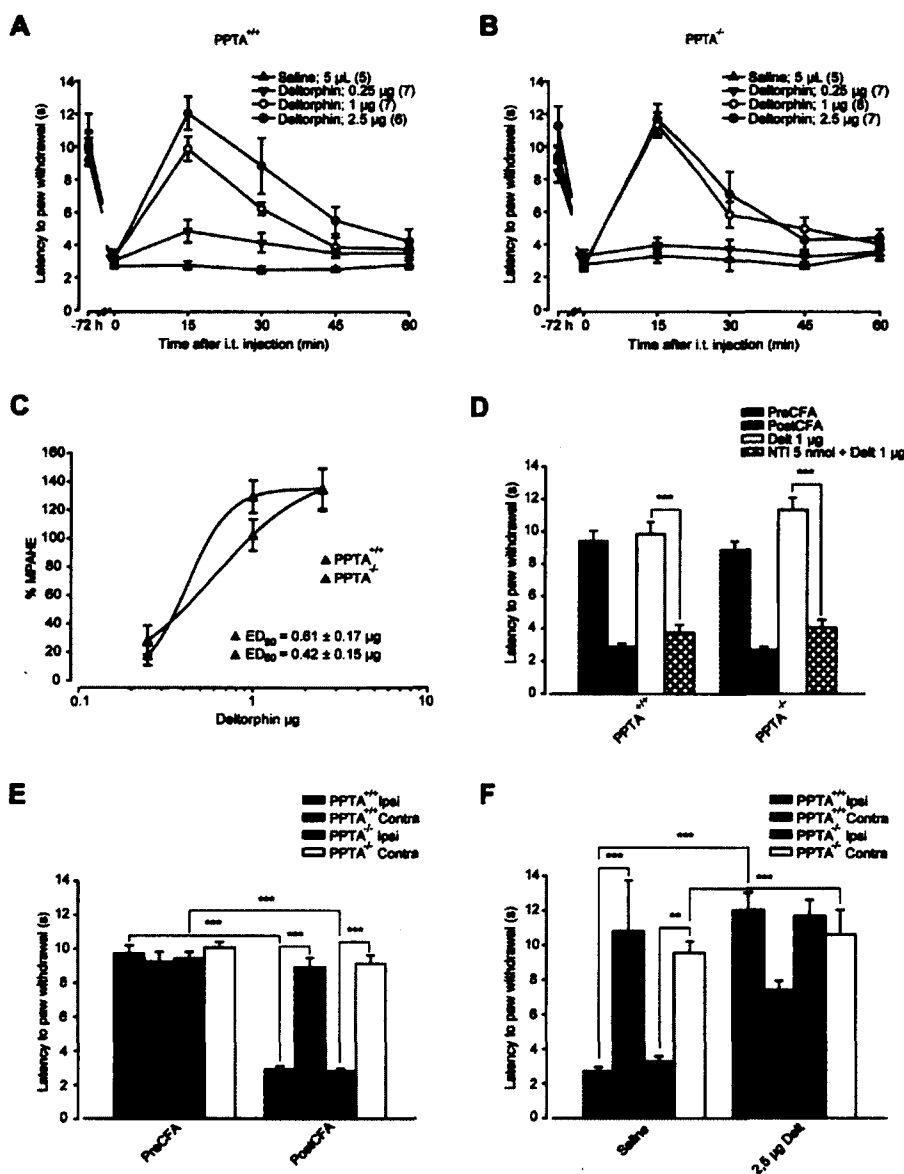


Figure 3 Antihyperalgesic effect of deltorphin II in PPTA^{+/+} and PPTA^{-/-} mice. (A) PPTA^{+/+} mice were injected with CFA in the plantar surface of the right hind paw. Seventy-two hours after CFA injection, the latency to paw withdrawal (in s) was measured every 15 min (from 15 to 60 min) after intrathecal injection of saline (5 μ L) or deltorphin II (0.25, 1, or 2.5 μ g). Intrathecal injection of deltorphin II induced a dose-dependent relief of thermal hyperalgesia (ipsilateral hind paw). The antihyperalgesic effect of deltorphin II peaked 15 min after the injection. The baseline latency to paw withdrawal before injection of CFA is shown at -72 h and the baseline withdrawal latency 72 h after CFA (i.e. before injection of saline or deltorphin II) is shown at time 0. (B) PPTA^{-/-} mice were treated as described in (A). A time- and dose-dependent relief of thermal hyperalgesia induced by deltorphin II was also observed in PPTA^{-/-} mice. (C) Non-linear regressions were performed to evaluate the analgesic efficacy of deltorphin II (ED₅₀). The ED₅₀ value for PPTA^{+/+} mice was 0.61 \pm 0.17 μ g and 0.42 \pm 0.15 μ g for

PPTA^{-/-} mice. The similar ED₅₀ values suggest that deltorphin II has comparable analgesic efficacy in both genotypes. (D) Naltrindole (NTI; 5 nmol) was injected intrathecally 15 min before the injection of 1 µg i.t. deltorphin II (Delt). The latency to paw withdrawal was measured at 15 min after deltorphin II injection. In PPTA^{+/+} and PPTA^{-/-} mice, the pre-injection of naltrindole blocked the antihyperalgesic effect of deltorphin II (n=5 for both NTI 5 nmol + Delt 1µg groups). (E) The baseline latencies to paw withdrawal were the same before and after CFA injection in both genotypes and CFA does not affect the contralateral paw. (F) No effect of deltorphin II was observed in the contralateral hind paw at the doses used in these experiments. *** $P < 0.001$ and ** $P < 0.01$ using a two-way ANOVA followed by a Bonferroni post-hoc test. The numbers in parentheses indicate the number of animals in each group.

Antinociception induced by deltorphin II in PPTA^{+/+} and PPTA^{-/-}

To test the possibility that SP plays a role in regulating DOPR functions in acute pain relief, we used the tail flick test (tail immersion test in a water bath at 52°C) to measure the antinociceptive effects of intrathecal deltorphin II. As shown in Fig. 4A and Fig. 4B, the absence of SP in PPTA^{-/-} mice did not modify the baseline latency to tail withdrawal (3.51 ± 0.11 s) compared to PPTA wildtype littermates (3.70 ± 0.12 s). In both genotypes, intrathecal deltorphin II produced comparable analgesia which peaked at 10 min post-injection. Indeed, the latency to tail withdrawal reached 6.17 ± 0.36 s and 6.29 ± 0.43 s at 2.5 µg and 7.26 ± 0.42 s and 7.39 ± 0.85 s at 5 µg of intrathecal deltorphin II (for PPTA^{+/+} and PPTA^{-/-} mice, respectively). The latency to tail withdrawal returned to baseline 40 to 60 min after deltorphin II injection. Intrathecal injection of saline (5 µL) produced no significant analgesia (the latencies to tail withdrawal for PPTA^{+/+} and PPTA^{-/-} were respectively 3.49 ± 0.35 s and 3.15 ± 0.61 s 10 min after saline injection).

The %MPE values of intrathecal deltorphin II were calculated from the latencies to tail withdrawal obtained 10 min post-injection (Fig. 4C). Whereas intrathecal injection of saline produced no effect ($-3.23 \pm 5.56\%$ and $-5.48 \pm 9.35\%$ for PPTA^{+/+} and PPTA^{-/-}, respectively), 2.5 µg and 5 µg of deltorphin II produced significant antinociception both in wildtype ($39.23 \pm 5.66\%$ and $56.48 \pm 6.60\%$, respectively; $P < 0.01$ and $P < 0.001$, $F_{2,1} = 28.30$, vs. %MPE_{Saline}, using a two-way ANOVA followed by a Bonferroni post-hoc test) and knockout mice ($42.88 \pm 6.66\%$ and $59.83 \pm 13.07\%$; $P < 0.01$ and $P < 0.001$, $F_{2,1} = 28.30$ vs. %MPE_{Saline}, using a two-way ANOVA followed by a Bonferroni post-hoc

test). At any dose, the analgesic effect of deltorphin II was not significantly different between genotypes ($P = 0.8230$, $F_{2,1} = 0.0509$ using a two-way ANOVA followed by a Bonferroni post-hoc test).

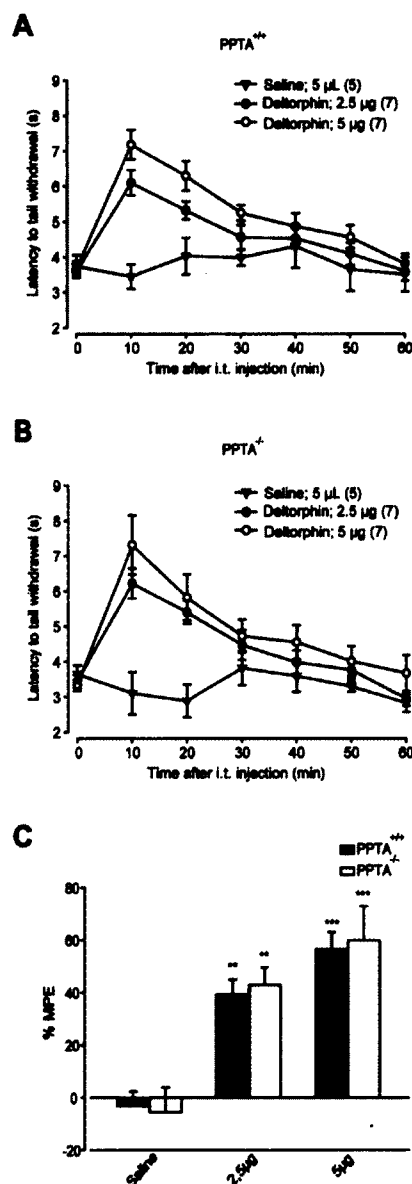


Figure 4 Antinociception induced by deltorphin II in PPTA^{-/-} and PPTA^{+/+} mice. (A) Tail flick latencies (in s) to noxious heat (tail immersion in 52°C hot water) were recorded every 10 min (from 0 to 60 min) following intrathecal injection of saline (5 μ L) or deltorphin II (2.5 or 5 μ g). Intrathecal deltorphin II produced significant antinociception at 10 and 20 min in PPTA^{+/+} mice. (B) PPTA^{-/-} mice were treated as described in (A). Intrathecal deltorphin II also produced antinociception in PPTA^{-/-} mice. (C) The %MPE of intrathecal deltorphin II or saline at 10 min was calculated for each dose tested.

Intrathecal injection of deltorphin II (2.5 μ g and 5 μ g) induced similar analgesia in both genotypes. ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ when deltorphin II 2.5 μ g and 5 μ g are compared to saline measurements from the same genotype; two-way ANOVA followed by a Bonferroni post-hoc test).

Discussion:

In the present study, we first confirmed that substance P (SP) deficient mice developed an equivalent level of edema and thermal hyperalgesia compared to wildtype animals following an injection of complete Freund's adjuvant (CFA) in the hind paw. Using the CFA model of inflammation, we demonstrated that the enhanced antihyperalgesic effects of intrathecal deltorphin II were maintained in SP-deficient mice. As opposed to results previously published by others (Guan *et al.*, 2005), we observed that analgesia induced by deltorphin II in the water tail flick test was similar in wildtype and SP-deficient mice. Our observations therefore suggest that SP is not involved in the functional competence of delta opioid receptors (DOPRs), at least in the CFA model of inflammation.

The delta opioid receptor was shown to be mainly expressed at the intracellular level (Cheng *et al.*, 1995, 1997; Zhang *et al.*, 1998; Cahill *et al.*, 2001a). Interestingly, it is generally well accepted that DOPRs are exported to the neuronal plasma membrane through a regulated mechanism of exocytosis (Cahill *et al.*, 2007). In particular, we have shown that membrane expression of DOPRs in spinal cord and dorsal root ganglia (DRG) neurons was enhanced following stimulation of mu opioid receptors (MOPRs) (Cahill *et al.*, 2001b; Morinville *et al.*, 2003, 2004a; Gendron *et al.*, 2006) and under inflammatory pain conditions (Cahill *et al.*, 2003; Morinville *et al.*, 2004b; Gendron *et al.*, 2006). This effect was accompanied by an increased analgesic efficacy of DOPR selective agonists (Cahill *et al.*, 2001b, 2003; Morinville *et al.*, 2003; Gendron *et al.*, 2007a, b). Others have also observed enhanced DOPR-mediated analgesia following chronic activation of MOPRs (Hack *et al.*, 2005; Negus *et al.*, 2010) and kappa opioid receptors (Khotib *et al.*, 2004), or under inflammatory (Stewart & Hammond, 1994; Fraser *et al.*, 2000; Hurley & Hammond, 2000; Petrillo *et al.*, 2003) and neuropathic pain conditions (Mika *et al.*, 2001; Petrillo *et al.*, 2003; Holdridge & Cahill, 2007). Among the other putative mechanisms of DOPR trafficking (Bie & Pan, 2007; Cahill *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2010), it was recently postulated that SP plays an essential role in controlling membrane targeting of DOPRs in DRG neurons (Guan *et al.*, 2005). Indeed, it has been proposed

that the SP domain of protachykinin A, the precursor for substance P, physically interacts with DOPR in large dense core vesicles (LDCV). This interaction was hypothesized to promote plasma membrane insertion of DOPRs as the LDCV exocytose following neuron depolarization/activation. Interestingly, Guan and colleagues observed that the absence of SP not only altered membrane expression of DOPRs, but also the analgesic effects of DOPR agonists in the tail flick assay (Guan *et al.*, 2005).

Using SP-deficient mice (PPTA^{-/-}), this study investigated the role of this neuropeptide in mediating the trafficking of DOPRs under inflammatory pain conditions induced by an injection of complete Freund's adjuvant (CFA). In this model, we first confirmed that CFA-induced development of inflammation and thermal hyperalgesia was not altered in PPTA^{-/-} mice. As previously shown by others (Cao *et al.*, 1998), we observed hind paw edema three days after CFA injection which did not differ between PPTA^{-/-} and wildtype littermate mice. Although peripheral release of SP usually contributes to inflammation (Helke *et al.*, 1990; Woolf & Salter, 2000), CFA is recognized to produce a non-neurogenic type of inflammation (Hylden *et al.*, 1992), meaning that this particular type of inflammation is independent from the activity of primary afferents.

In DRG neurons, SP is mainly expressed in small diameter, unmyelinated nociceptive fibers (McCarthy & Lawson, 1989). In contrast, DOPRs are found in equal proportions in small, medium and large DRG neurons (Wang & Wessendorf, 2001). In our previous studies, we demonstrated that the activation of MOPRs by morphine increased the membrane density of DOPRs in all subsets of DRG neurons (Gendron *et al.*, 2006). Interestingly, we observed that inflammation induced by CFA specifically enhanced DOPR membrane insertion in small and medium DRG neurons, therefore suggesting that DOPR targeting involves specific neuronal activation (Gendron *et al.*, 2006). These observations, which further suggest that not all DOPR-expressing neurons contain SP, led us to propose that SP is not involved in the regulation of DOPR trafficking and DOPR-mediated analgesia in the non-neurogenic CFA model of inflammation. To verify this hypothesis, PPTA^{-/-} and wildtype littermate mice were injected in the hind paw with CFA. Three days after CFA injection, the antihyperalgesic efficacy of intrathecal deltorphin II, a DOPR selective agonist, was measured in both

genotypes using the thermal plantar test. Interestingly, ED₅₀ for deltorphin II in PPTA^{-/-} and wildtype littermates revealed similar antihyperalgesic efficacies of this DOPR agonist in both genotypes. Because deltorphin II-mediated supraspinal analgesia was shown to be present in DOPR-KO mice (Scherrer *et al.*, 2004), one could argue that deltorphin II might induce antihyperalgesia via a direct activation of MOPRs. However, using low dose of naltrindole, a selective DOPR antagonist, we showed that the action of deltorphin II was mediated by DOPR in our experiments. This is in accordance with our previous study (Gendron *et al.*, 2007b).

It is obvious that both DOPR and SP need to be co-expressed in the same cells, ultimately in the same subcellular structures, to physically interact. However, co-expression of SP and DOPR in same cells is a matter of controversy. Using *in situ* hybridization and immunohistochemical techniques, many groups have reported the presence of DOPRs in DRG neurons and nerve terminals containing SP (Dado *et al.*, 1993; Arvidsson *et al.*, 1995; Minami *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 1998; Guan *et al.*, 2005; Riedl *et al.*, 2009). Another group has also shown that spinal DOPRs mediate inhibition of primary afferent-evoked SP release (Kondo *et al.*, 2005), further supporting the hypothesis that DOPR is expressed by SP-containing C-fibers. In contrast, Scherrer and colleagues recently reported that SP rarely colocalizes with DOPR (~2% of DOPR positive cells express SP) in enhanced Green Fluorescent Protein (eGFP)-DOPR knockin mice (Scherrer *et al.*, 2009). This observation supports a previous report that showed a very low level of overlap between SP immunostaining and DOPR mRNA in rodent DRGs (Mennicken *et al.*, 2003). However, it was shown that eGFP tags might affect the expression pattern and the cellular localization of DOPRs (Wang *et al.*, 2008) as it affects these properties for other G protein-coupled receptors (McLean & Milligan, 2000; Madziva & Edwardson, 2001; McDonald *et al.*, 2007). In that regard, although Scherrer (2009) and Mennicken (2003) agree that SP and DOPR rarely colocalizes in rodent DRG neurons, they observed opposing results when they examined isolectin B4 and DOPR double labeling. In our experiments, at the electronic microscopy level we have rarely observed immunogold labeling of DOPR in association with LDCV (Cahill *et al.*, 2001a; Gendron *et al.*, 2006). However, DOPR-like immunoreactivity was observed in LDCV-containing DRG neurons (Gendron *et al.*, 2006) and in spinal cord nerve terminals (Cahill

et al., 2001a). Admittedly, we never investigated whether or not these LDCV were filled with SP. On the other hand, we have previously shown that a subpopulation of small DRG neurons was upregulating cell surface DOPRs following hind paw capsaicin injection in rats (Gendron *et al.*, 2006). Similarly, other investigators have shown that capsaicin treatment was sufficient to increase the cell surface expression of DOPRs in ganglia neurons (Bao *et al.*, 2003). Because capsaicin specifically binds and activates transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1), which is located in small DRG neurons under normal conditions (Caterina *et al.*, 1997; Michael & Priestley, 1999; Amaya *et al.*, 2003), these observations strongly suggest that at least a discrete population of neurons co-express DOPR and SP.

In a previous study, we revealed the existence of a dichotomy between the antihyperalgesic and antinociceptive effects of DOPR agonists (Gendron *et al.*, 2007a; Beaudry *et al.*, 2009). In particular, we observed that the antinociceptive effects of intrathecal deltorphin II (as measured with the tail flick assay) rapidly decreased after repeated injections while its antihyperalgesic effects remained stable (Beaudry *et al.*, 2009). To further characterize the discrepancy between the antihyperalgesic and antinociceptive effects of DOPR agonists and DOPR trafficking in a diverse population of neurons, we measured the antinociception induced by deltorphin II in PPTA^{-/-} and wildtype littermate mice in the 52°C water tail flick assay. First, we observed that both genotypes had similar baseline latency to tail withdrawal in this assay. Although this effect was also seen by others (Cao *et al.*, 1998; Zimmer *et al.*, 1998; Guan *et al.*, 2005), since SP-positive neurons are activated at 52°C (Abbadie *et al.*, 1997; King *et al.*, 2005) one would have expected different baseline tail flick withdrawal latencies between PPTA^{+/+} and PPTA^{-/-} mice. However, thermal stimuli are less effective than mechanical stimuli to produce SP release (Abbadie *et al.*, 1997). Although we used similar experimental conditions to those used by Guan and colleagues (2005), surprisingly our results failed to demonstrate any reduction in the antinociceptive efficacy of intrathecal deltorphin II in the hot water tail immersion test in PPTA^{-/-} mice. This discrepancy could possibly be explained by the fact that Guan and colleagues used a different strain of PPTA^{-/-} mice. We have used the PPTA^{-/-} mice that were previously described by Cao and colleagues (1998) with the exception that our mice have been backcrossed at least 10

times with C57BL/6 mice. In contrast, Guan and colleagues used mice described by Zimmer and colleagues (1998). Although both strains do not express SP, they were generated on a different genetic background. Whether this difference contributes to the observed discrepancy between our results and the one published by Guan and colleagues (2005) is not known. For instance, the two strains of mice are different because the mice used by Guan and colleagues have decreased sensitivity to formalin but have unchanged reactions to abdominal acetic acid (Zimmer *et al.*, 1998). In contrast, the other strain of mice had decreased sensitivity to abdominal acetic acid but unchanged pain behavior following formalin injection (Cao *et al.*, 1998). Regardless of these discrepancies, the absence of SP is common to both strains of mice. Therefore, our observations strongly suggest that SP is not essential for DOPR to be functionally competent and, by extension, that the trafficking and membrane insertion of DOPRs is not affected by the absence of SP.

Conclusion:

Despite the possibility that DOPR and SP co-exist in the same neurons, a putative interaction between these two molecules is not responsible for promoting DOPR functional competence in the CFA model of inflammation. In fact, an absence of SP in PPTA^{-/-} mice failed to translate into a loss of antihyperalgesic effects of intrathecal deltorphin II. In contrast, we have previously shown that expression of MOPR is necessary for CFA to increase the efficacy of DOPR selective agonists (Gendron *et al.*, 2007b). Altogether, these observations revealed that an interaction of DOPR with MOPR is more important than an interaction with SP to promote DOPR insertion into the plasma membrane and to enhance the functional competence of the receptors. Further studies are needed to better understand the precise mechanisms through which DOPR interacts with MOPR.

Acknowledgments:

We thank Hélène Beaudry and Julie Desroches for their critical reading of the manuscript. This work was supported by grant MOP-84538 from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) to LG. LG is the recipient of a Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ) Junior 1 salary support and DD is the recipient of a scholarship from the Frederick Banting and Charles Best Canada Graduate Scholarships - Master's Award awarded by the CIHR.

References:

- Abbadie, C., Trafton, J., Liu, H., Mantyh, P.W. & Basbaum, A.I. (1997) Inflammation increases the distribution of dorsal horn neurons that internalize the neurokinin-1 receptor in response to noxious and non-noxious stimulation. *J Neurosci*, **17**, 8049-8060.
- Amaya, F., Oh-hashii, K., Naruse, Y., Iijima, N., Ueda, M., Shimosato, G., Tominaga, M., Tanaka, Y. & Tanaka, M. (2003) Local inflammation increases vanilloid receptor 1 expression within distinct subgroups of DRG neurons. *Brain Res*, **963**, 190-196.
- Arvidsson, U., Dado, R.J., Riedl, M., Lee, J.H., Law, P.Y., Loh, H.H., Elde, R. & Wessendorf, M.W. (1995) delta-Opioid receptor immunoreactivity: distribution in brainstem and spinal cord, and relationship to biogenic amines and enkephalin. *J Neurosci*, **15**, 1215-1235.
- Bao, L., Jin, S.X., Zhang, C., Wang, L.H., Xu, Z.Z., Zhang, F.X., Wang, L.C., Ning, F.S., Cai, H.J., Guan, J.S., Xiao, H.S., Xu, Z.Q., He, C., Hokfelt, T., Zhou, Z. & Zhang, X. (2003) Activation of delta opioid receptors induces receptor insertion and neuropeptide secretion. *Neuron*, **37**, 121-133.
- Beaudry, H., Proteau-Gagne, A., Li, S., Dory, Y., Chavkin, C. & Gendron, L. (2009) Differential noxious and motor tolerance of chronic delta opioid receptor agonists in rodents. *Neuroscience*, **161**, 381-391.
- Bie, B. & Pan, Z.Z. (2007) Trafficking of central opioid receptors and descending pain inhibition. *Mol Pain*, **3**, 37.
- Brandt, M.R., Furness, M.S., Rice, K.C., Fischer, B.D. & Negus, S.S. (2001) Studies of tolerance and dependence with the delta-opioid agonist SNC80 in rhesus monkeys responding under a schedule of food presentation. *J Pharmacol Exp Ther*, **299**, 629-637.
- Cahill, C.M., Holdridge, S.V. & Morinville, A. (2007) Trafficking of delta-opioid receptors and other G-protein-coupled receptors: implications for pain and analgesia. *Trends Pharmacol Sci*, **28**, 23-31.
- Cahill, C.M., McClellan, K.A., Morinville, A., Hoffert, C., Hubatsch, D., O'Donnell, D. & Beaudet, A. (2001a) Immunohistochemical distribution of delta opioid receptors in the rat central nervous system: evidence for somatodendritic labeling and antigen-specific cellular compartmentalization. *J Comp Neurol*, **440**, 65-84.
- Cahill, C.M., Morinville, A., Hoffert, C., O'Donnell, D. & Beaudet, A. (2003) Up-regulation and trafficking of delta opioid receptor in a model of chronic inflammation: implications for pain control. *Pain*, **101**, 199-208.

- Cahill, C.M., Morinville, A., Lee, M.C., Vincent, J.P., Collier, B. & Beaudet, A. (2001b) Prolonged morphine treatment targets delta opioid receptors to neuronal plasma membranes and enhances delta-mediated antinociception. *J Neurosci*, **21**, 7598-7607.
- Cao, Y.Q., Mantyh, P.W., Carlson, E.J., Gillespie, A.M., Epstein, C.J. & Basbaum, A.I. (1998) Primary afferent tachykinins are required to experience moderate to intense pain. *Nature*, **392**, 390-394.
- Caterina, M.J., Schumacher, M.A., Tominaga, M., Rosen, T.A., Levine, J.D. & Julius, D. (1997) The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*, **389**, 816-824.
- Cheng, P.Y., Liu-Chen, L.Y. & Pickel, V.M. (1997) Dual ultrastructural immunocytochemical labeling of mu and delta opioid receptors in the superficial layers of the rat cervical spinal cord. *Brain Res*, **778**, 367-380.
- Cheng, P.Y., Svingos, A.L., Wang, H., Clarke, C.L., Jenab, S., Beczkowska, I.W., Inturrisi, C.E. & Pickel, V.M. (1995) Ultrastructural immunolabeling shows prominent presynaptic vesicular localization of delta-opioid receptor within both enkephalin- and nonenkephalin-containing axon terminals in the superficial layers of the rat cervical spinal cord. *J Neurosci*, **15**, 5976-5988.
- Dado, R.J., Law, P.Y., Loh, H.H. & Elde, R. (1993) Immunofluorescent identification of a delta (delta)-opioid receptor on primary afferent nerve terminals. *Neuroreport*, **5**, 341-344.
- Elde, R., Arvidsson, U., Riedl, M., Vulchanova, L., Lee, J.H., Dado, R., Nakano, A., Chakrabarti, S., Zhang, X., Loh, H.H. & et al. (1995) Distribution of neuropeptide receptors. New views of peptidergic neurotransmission made possible by antibodies to opioid receptors. *Ann N Y Acad Sci*, **757**, 390-404.
- Fairbanks, C.A. (2003) Spinal delivery of analgesics in experimental models of pain and analgesia. *Adv Drug Deliv Rev*, **55**, 1007-1041.
- Fraser, G.L., Gaudreau, G.A., Clarke, P.B., Menard, D.P. & Perkins, M.N. (2000) Antihyperalgesic effects of delta opioid agonists in a rat model of chronic inflammation. *Br J Pharmacol*, **129**, 1668-1672.
- Gallantine, E.L. & Meert, T.F. (2005) A comparison of the antinociceptive and adverse effects of the mu-opioid agonist morphine and the delta-opioid agonist SNC80. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, **97**, 39-51.
- Gendron, L., Esdaile, M.J., Mennicken, F., Pan, H., O'Donnell, D., Vincent, J.P., Devi, L.A., Cahill, C.M., Stroh, T. & Beaudet, A. (2007a) Morphine priming in rats

with chronic inflammation reveals a dichotomy between antihyperalgesic and antinociceptive properties of deltorphin. *Neuroscience*, **144**, 263-274.

- Gendron, L., Lucido, A.L., Mennicken, F., O'Donnell, D., Vincent, J.P., Stroh, T. & Beaudet, A. (2006) Morphine and pain-related stimuli enhance cell surface availability of somatic delta-opioid receptors in rat dorsal root ganglia. *J Neurosci*, **26**, 953-962.
- Gendron, L., Pintar, J.E. & Chavkin, C. (2007b) Essential role of mu opioid receptor in the regulation of delta opioid receptor-mediated antihyperalgesia. *Neuroscience*, **150**, 807-817.
- Guan, J.S., Xu, Z.Z., Gao, H., He, S.Q., Ma, G.Q., Sun, T., Wang, L.H., Zhang, Z.N., Lena, I., Kitchen, I., Elde, R., Zimmer, A., He, C., Pei, G., Bao, L. & Zhang, X. (2005) Interaction with vesicle luminal protachykinin regulates surface expression of delta-opioid receptors and opioid analgesia. *Cell*, **122**, 619-631.
- Hack, S.P., Bagley, E.E., Chieng, B.C. & Christie, M.J. (2005) Induction of delta-opioid receptor function in the midbrain after chronic morphine treatment. *J Neurosci*, **25**, 3192-3198.
- Helke, C.J., Krause, J.E., Mantyh, P.W., Couture, R. & Bannon, M.J. (1990) Diversity in mammalian tachykinin peptidergic neurons: multiple peptides, receptors, and regulatory mechanisms. *Faseb J*, **4**, 1606-1615.
- Hokfelt, T., Kellerth, J.O., Nilsson, G. & Pernow, B. (1975) Experimental immunohistochemical studies on the localization and distribution of substance P in cat primary sensory neurons. *Brain Res*, **100**, 235-252.
- Holdridge, S.V. & Cahill, C.M. (2007) Spinal administration of a delta opioid receptor agonist attenuates hyperalgesia and allodynia in a rat model of neuropathic pain. *Eur J Pain*, **11**, 685-693.
- Hurley, R.W. & Hammond, D.L. (2000) The analgesic effects of supraspinal mu and delta opioid receptor agonists are potentiated during persistent inflammation. *J Neurosci*, **20**, 1249-1259.
- Hylden, J.L., Noguchi, K. & Ruda, M.A. (1992) Neonatal capsaicin treatment attenuates spinal Fos activation and dynorphin gene expression following peripheral tissue inflammation and hyperalgesia. *J Neurosci*, **12**, 1716-1725.
- Khotib, J., Narita, M., Suzuki, M., Yajima, Y. & Suzuki, T. (2004) Functional interaction among opioid receptor types: up-regulation of mu- and delta-opioid receptor functions after repeated stimulation of kappa-opioid receptors. *Neuropharmacology*, **46**, 531-540.

- King, T., Gardell, L.R., Wang, R., Vardanyan, A., Ossipov, M.H., Malan, T.P., Jr., Vanderah, T.W., Hunt, S.P., Hruby, V.J., Lai, J. & Porreca, F. (2005) Role of NK-1 neurotransmission in opioid-induced hyperalgesia. *Pain*, **116**, 276-288.
- Kondo, I., Marvizon, J.C., Song, B., Salgado, F., Codeluppi, S., Hua, X.Y. & Yaksh, T.L. (2005) Inhibition by spinal mu- and delta-opioid agonists of afferent-evoked substance P release. *J Neurosci*, **25**, 3651-3660.
- Madziva, M.T. & Edwardson, J.M. (2001) Trafficking of green fluorescent protein-tagged muscarinic M4 receptors in NG108-15 cells. *Eur J Pharmacol*, **428**, 9-18.
- May, C.N., Dashwood, M.R., Whitehead, C.J. & Mathias, C.J. (1989) Differential cardiovascular and respiratory responses to central administration of selective opioid agonists in conscious rabbits: correlation with receptor distribution. *Br J Pharmacol*, **98**, 903-913.
- McCarthy, P.W. & Lawson, S.N. (1989) Cell type and conduction velocity of rat primary sensory neurons with substance P-like immunoreactivity. *Neuroscience*, **28**, 745-753.
- McDonald, N.A., Henstridge, C.M., Connolly, C.N. & Irving, A.J. (2007) Generation and functional characterization of fluorescent, N-terminally tagged CB1 receptor chimeras for live-cell imaging. *Mol Cell Neurosci*, **35**, 237-248.
- McLean, A.J. & Milligan, G. (2000) Ligand regulation of green fluorescent protein-tagged forms of the human beta(1)- and beta(2)-adrenoceptors; comparisons with the unmodified receptors. *Br J Pharmacol*, **130**, 1825-1832.
- Mennicken, F., Zhang, J., Hoffert, C., Ahmad, S., Beaudet, A. & O'Donnell, D. (2003) Phylogenetic changes in the expression of delta opioid receptors in spinal cord and dorsal root ganglia. *J Comp Neurol*, **465**, 349-360.
- Michael, G.J. & Priestley, J.V. (1999) Differential expression of the mRNA for the vanilloid receptor subtype 1 in cells of the adult rat dorsal root and nodose ganglia and its downregulation by axotomy. *J Neurosci*, **19**, 1844-1854.
- Mika, J., Przewlocki, R. & Przewlocka, B. (2001) The role of delta-opioid receptor subtypes in neuropathic pain. *Eur J Pharmacol*, **415**, 31-37.
- Minami, M., Maekawa, K., Yabuuchi, K. & Satoh, M. (1995) Double in situ hybridization study on coexistence of mu-, delta- and kappa-opioid receptor mRNAs with preprotachykinin A mRNA in the rat dorsal root ganglia. *Brain Res Mol Brain Res*, **30**, 203-210.
- Morinville, A., Cahill, C.M., Aibak, H., Rymar, V.V., Pradhan, A., Hoffert, C., Mennicken, F., Stroh, T., Sadikot, A.F., O'Donnell, D., Clarke, P.B., Collier, B.,

- Henry, J.L., Vincent, J.P. & Beaudet, A. (2004a) Morphine-induced changes in delta opioid receptor trafficking are linked to somatosensory processing in the rat spinal cord. *J Neurosci*, **24**, 5549-5559.
- Morinville, A., Cahill, C.M., Esdaile, M.J., Aibak, H., Collier, B., Kieffer, B.L. & Beaudet, A. (2003) Regulation of delta-opioid receptor trafficking via mu-opioid receptor stimulation: evidence from mu-opioid receptor knock-out mice. *J Neurosci*, **23**, 4888-4898.
- Morinville, A., Cahill, C.M., Kieffer, B., Collier, B. & Beaudet, A. (2004b) Mu-opioid receptor knockout prevents changes in delta-opioid receptor trafficking induced by chronic inflammatory pain. *Pain*, **109**, 266-273.
- Negus, S.S., Banks, M.L., Folk, J.E. & Rice, K.C. (2010) Modulation of delta opioid agonist-induced antinociception by repeated morphine pretreatment in rhesus monkeys. *Life Sci*.
- Petrillo, P., Angelici, O., Bingham, S., Ficalora, G., Garnier, M., Zaratin, P.F., Petrone, G., Pozzi, O., Sbacchi, M., Stean, T.O., Upton, N., Dondio, G.M. & Scheideler, M.A. (2003) Evidence for a selective role of the delta-opioid agonist [8R-(4bS*,8aalpha,8abeta, 12bbeta)]7,10-Dimethyl-1-methoxy-11-(2-methylpropyl)oxycarbonyl 5,6,7,8,12,12b-hexahydro-(9H)-4,8-methanobenzofuro[3,2-e]pyrrolo[2,3-g]iso quinoline hydrochloride (SB-235863) in blocking hyperalgesia associated with inflammatory and neuropathic pain responses. *J Pharmacol Exp Ther*, **307**, 1079-1089.
- Porreca, F., Mosberg, H.I., Hurst, R., Hruby, V.J. & Burks, T.F. (1984) Roles of mu, delta and kappa opioid receptors in spinal and supraspinal mediation of gastrointestinal transit effects and hot-plate analgesia in the mouse. *J Pharmacol Exp Ther*, **230**, 341-348.
- Riedl, M.S., Schnell, S.A., Overland, A.C., Chabot-Dore, A.J., Taylor, A.M., Ribeiro-da-Silva, A., Elde, R.P., Wilcox, G.L. & Stone, L.S. (2009) Coexpression of alpha 2A-adrenergic and delta-opioid receptors in substance P-containing terminals in rat dorsal horn. *J Comp Neurol*, **513**, 385-398.
- Scherrer, G., Befort, K., Contet, C., Becker, J., Matifas, A. & Kieffer, B.L. (2004) The delta agonists DPDPE and deltorphin II recruit predominantly mu receptors to produce thermal analgesia: a parallel study of mu, delta and combinatorial opioid receptor knockout mice. *Eur J Neurosci*, **19**, 2239-2248.
- Scherrer, G., Imamachi, N., Cao, Y.Q., Contet, C., Mennicken, F., O'Donnell, D., Kieffer, B.L. & Basbaum, A.I. (2009) Dissociation of the opioid receptor mechanisms that control mechanical and heat pain. *Cell*, **137**, 1148-1159.

- Stewart, P.E. & Hammond, D.L. (1994) Activation of spinal delta-1 or delta-2 opioid receptors reduces carrageenan-induced hyperalgesia in the rat. *J Pharmacol Exp Ther*, **268**, 701-708.
- Szeto, H.H., Soong, Y., Wu, D., Olariu, N., Kett, A., Kim, H. & Clapp, J.F. (1999) Respiratory depression after intravenous administration of delta-selective opioid peptide analogs. *Peptides*, **20**, 101-105.
- Wang, H. & Wessendorf, M.W. (2001) Equal proportions of small and large DRG neurons express opioid receptor mRNAs. *J Comp Neurol*, **429**, 590-600.
- Wang, H.B., Guan, J.S., Bao, L. & Zhang, X. (2008) Distinct subcellular distribution of delta-opioid receptor fused with various tags in PC12 cells. *Neurochem Res*, **33**, 2028-2034.
- Woolf, C.J. & Salter, M.W. (2000) Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *Science*, **288**, 1765-1769.
- Zhang, X., Bao, L., Arvidsson, U., Elde, R. & Hokfelt, T. (1998) Localization and regulation of the delta-opioid receptor in dorsal root ganglia and spinal cord of the rat and monkey: evidence for association with the membrane of large dense-core vesicles. *Neuroscience*, **82**, 1225-1242.
- Zhang, X., Bao, L. & Ma, G.Q. (2010) Sorting of neuropeptides and neuropeptide receptors into secretory pathways. *Prog Neurobiol*, **90**, 276-283.
- Zimmer, A., Zimmer, A.M., Baffi, J., Usdin, T., Reynolds, K., Konig, M., Palkovits, M. & Mezey, E. (1998) Hypoalgesia in mice with a targeted deletion of the tachykinin 1 gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, **95**, 2630-2635.

4 Matériel et méthodes (hors article)

4.1 Génération de la colonie de souris PPTA

Tel que décrit précédemment (Dubois et Gendron, 2010), les expériences ont été réalisées chez des souris mâles adultes. Des souris invalidées pour le gène de la préprotachykinine A (PPTA^{-/-}) et des souris sauvages (PPTA^{+/+}) de même ascendance ont été générées à partir de souris hétérozygotes PPTA^{+/-}. Le génotype de ces souris a été identifié en utilisant l'ADN extrait d'échantillons de leur queue. Brièvement, environ 0.5 cm de la queue de souris âgées de deux semaines a été coupé et digéré dans des tubes SST (BD, Franklin Lakes, NJ, USA) avec 1 mg/mL de protéinase K (Roche Applied Science, Mannheim, Allemagne) dans un tampon de lyse (0.3 M NaCl, 0.5% SDS, 0.01 M Tris-HCl pH8.0, 2 mM EDTA dans H₂O) à 56°C pendant 4 à 5 heures. Par la suite une solution de phénol :chloroforme :alcool isoamylique (25 :24 :1) (Bioshop, Burlington, Ontario, Canada) a été ajoutée et les tubes centrifugés à 2000G pendant 15 minutes à 4°C. Une seconde centrifugation de 10 minutes à 4°C a été effectuée, précédée de l'ajout de chloroforme : alcool isoamylique (24 :1). L'extrait obtenu a par la suite été transféré dans un tube contenant 3 M d'acétate de sodium, pH 5.2 et de l'éthanol 100%. Les tubes ont ensuite été centrifugés 15 minutes à 13 000 RPM à 4°C, puis le culot d'ADN obtenu a été lavé avec de l'éthanol 70% en centrifugeant à nouveau les tubes à 13 000 RPM pendant 10 minutes à 4°C. Le culot d'ADN a par la suite été dilué dans une solution de 10 µg/mL de RNase et d'H₂O et dosé à l'aide du NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, Delaware, USA). Ensuite, l'ADN a été amplifié par PCR à l'aide d'amorces permettant l'amplification d'un amplicon couvrant une partie supprimée du gène PPTA chez les souris PPTA^{-/-} (Amorce sens : GCTCATCAGTATGTGACATAGAAA, Amorce anti-sens : AGAATTTAAAGCTCTTTTGCC; Invitrogen, Carlsbad, Californie, USA). Les échantillons ont finalement été visualisés sur gel d'agarose 2.5% (Figure 16).

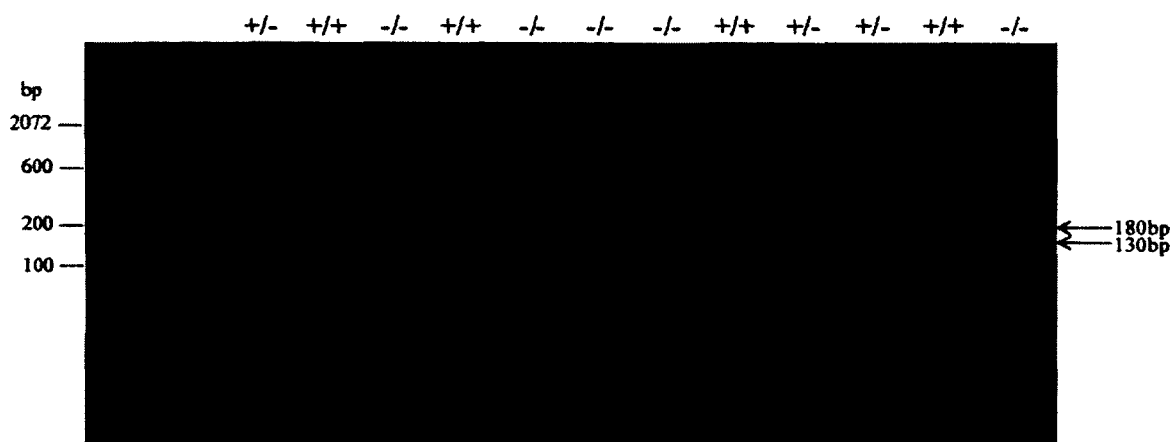


Figure 16 Exemple de gel d'agarose 2.5% de produits de réaction PCR de souris PPTA^{-/-} et PPTA^{+/+}. Chaque colonne représente un échantillon provenant d'un souris différente. En réalisant une réaction de PCR avec les amorces ciblant le gène PPTA, on obtient 2 bandes sur le gel d'agarose, une bande à 180 bp (représentant le gène PPTA intact) et une bande à 130 bp (représentant le gène PPTA tronqué). En fonction des différentes bandes obtenues, le génotype des souris peut être identifié (une bande à 180 bp : +/+ (homozygote positif pour PPTA); une bande à 130 bp : -/- (homozygote négatif pour PPTA); une bande à 130 bp et une bande à 180 bp : +/- (hétérozygote pour PPTA). (bp : paires de bases).

4.2 Microscopie électronique

Des études de microscopie électronique ont été conduites chez des souris PPTA^{-/-} et PPTA^{+/+} pour étudier l'impact de l'adjuvant complet de Freund (CFA) sur la localisation membranaire du récepteur opioïdérique delta (DOPR) dans les neurones de la moelle épinière. Les souris ont été anesthésiées avec 5% d'isoflurane et perfusées avec 15 mL d'héparine (6 U/mL d'héparine dans saline 0.9% froide), suivi de 30 mL d'un mélange de 3.75% acroléine (Electron Microscopy Sciences (EMS), Hatfield, Pennsylvanie, USA) et 2% PFA dans 0.2 M PB, pH 7.4 froid, et finalement avec 30 mL de 2% PFA froid dans le même tampon. Les moelles épinières ont été retirées par laminectomie, post-fixées dans 2% PFA pour 30 minutes à 4°C, puis placées dans une solution de 0.1 M PB à 4°C pendant 1 heure. La section lombaire L4-L6 des moelles épinières a été isolée et des coupes transversales (50 µm d'épaisseur) ont été obtenues à l'aide du Vibratome 3000 (Vibratome, St. Louis, Missouri, USA). Les coupes ont été incubées pour 30 minutes dans 1% sodium borohydride, puis rincées vigoureusement

avec 0.1 M PB. Elles ont par la suite été incubées pour 30 minutes avec une solution cryoprotectrice constituée de 25% sucrose et 3% glycérol dans du tampon PB avant d'être rapidement gelées avec de l'isopentane (-50°C), puis de l'azote liquide. Les coupes ont par la suite été rapidement dégelées dans 0.1 M PB, rincées avec du 0.1 M TBS et incubé 1 heure dans une solution de blocage constituée de 3% NGS à température pièce. Après de brefs lavages, les coupes ont été incubées 48 heures à 4°C avec un anticorps anti-DOPR lapin (1:2000, lot # LV1480422; Millipore, Billerica, Massachusetts, USA) dans 0.1 M TBS contenant 0.5% NGS. Après lavage, les coupes ont été pré-incubées 10 minutes dans une solution de 0.01 M PBS contenant 0.1% gélatine et 0.8% BSA, puis incubées 2 heures avec un anticorps secondaire anti-lapin IgG couplé à l'or (1:250; Nanogold anti-rabbit-Fab' (NRF) lot #15C739; Nanoprobes, Inc., Yaphank, New York, USA)) dilué dans une solution de 0.01 M PBS, 0.1% gélatine et 0.8% BSA. Les coupes ont ensuite été fixées 10 minutes avec du 2% glutaraldéhyde dans 0.01 M PBS et rincées avec un tampon 0.2 M citrate, pH 7.4. Les particules d'or ont été amplifiées par l'argent pendant 1 h 15 minutes en utilisant le kit d'amplification Aurion R-Gent Se-EM (lot # 90204/1; EMS, Hatfield, Pennsylvanie, USA). Les coupes ont par la suite été post-fixées en les incubant 40 minutes à température pièce dans 2% tétroxyde d'osmium dilué dans 0.2 M PB, lavées et déshydratées avec des concentrations croissantes d'éthanol. Puis, elles ont été pré-incubées avec de l'Epon 812 (EMS, Hatfield, Pennsylvanie, USA) et du propylène oxyde (EMS, Hatfield, Pennsylvanie, USA), incorporées dans une résine d'Epon 812 et placées entre des lamelles de plastique avant d'être cuites à 60°C pour 24 heures. De très mince sections (80 nm) ont été récupérées afin d'être examinées à l'aide d'un microscope électronique à transmission Hitachi H7500 (Hitachi, Mississauga, Ontario, Canada).

5 Résultats (hors article)

5.1 Localisation de DOPR par microscopie électronique

Dans un modèle de douleur inflammatoire induite par l'adjuvant complet de Freund (CFA), on observe une augmentation de récepteur opioïdergique delta (DOPR) localisé au niveau membranaire en comparaison avec des animaux sains (Cahill et al., 2003, Morinville et al., 2004b). Nous avons donc voulu vérifier si l'absence de substance P chez les souris PPTA^{-/-} influençait l'augmentation de récepteurs membranaires observée chez des souris préalablement injectées avec le CFA en utilisant la microscopie électronique (Figure 17). Les moelles épinières de souris PPTA^{-/-} et PPTA^{+/+} injectées ou non avec le CFA ont été incubées avec un anticorps sélectif contre DOPR et traitées pour être visualisées par microscopie électronique. De façon qualitative, la localisation des DOPR semble majoritairement intracellulaire en absence de traitement au CFA. Cependant, la sélectivité des anticorps ciblant DOPR a été récemment remise en question (Figure 7) (Scherrer et al., 2009). Pour éviter toute controverse quant à la sélectivité des anticorps utilisés, nous n'avons pas poursuivi avec la quantification des images obtenues et avons mis fin à cet aspect de l'étude. Dans notre modèle de douleur inflammatoire induite par le CFA, on ne peut donc confirmer que le maintien des propriétés analgésiques des agonistes DOPR observés chez les souris PPTA^{-/-} est corrélé avec une augmentation des niveaux membranaires de DOPR, tel que décrit préalablement chez les souris sauvages.

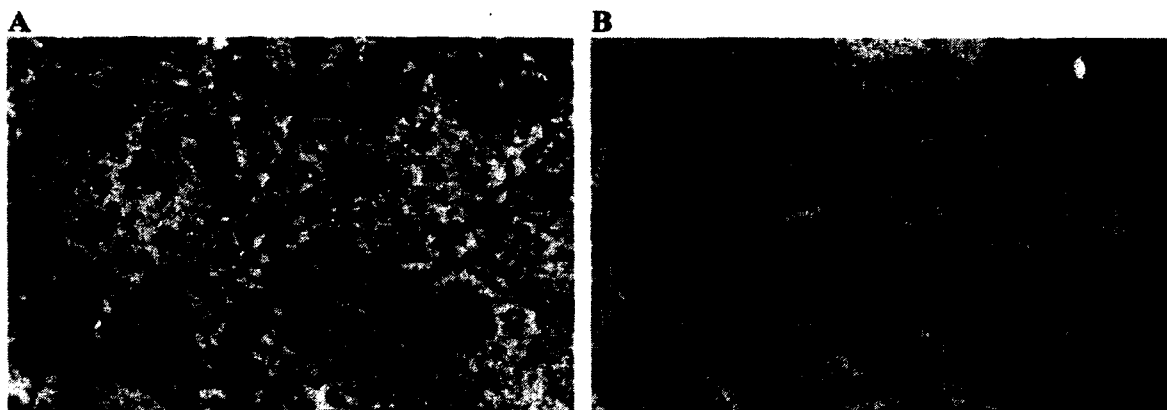


Figure 17 Localisation de DOPR dans les laminae superficielles de la corne dorsale de moelle épinière par microscopie électronique. (A) Voici un exemple de résultat obtenu lors des essais de microscopie électronique chez une souris PPTA^{+/+} saine. Peu de particules couplées à des grains d'or sont localisées au niveau membranaire dans les dendrites (flèches), la majorité des récepteurs delta semble localisé de façon intracellulaire. (B) Des résultats semblables ont été observés dans les moelles de souris PPTA^{-/-}. D'autres anticorps primaires anti-DOPR ont aussi été utilisés lors d'essais suivants (anticorps de lapin anti-rat anti-DOPR F8701 (1 :500) et F8702(1 :500)) et des résultats similaires ont été obtenus chez les souris PPTA^{-/-} et PPTA^{+/+}. Les images obtenues n'ont pas été quantifiées.

6. Discussion

6.1 Retour sur l'article

Dans cette étude, nous avons premièrement confirmé que les souris déficientes en substance P développaient des niveaux d'œdème et d'hyperalgésie thermique semblables à ceux obtenus avec des souris de type sauvage, suite à l'injection de l'adjuvant complet de Freund (CFA) dans la patte arrière. En utilisant un modèle de douleur inflammatoire induite par le CFA, nous avons démontré que l'augmentation des effets anti-hyperalgésiques observée suite à l'administration intrathécale de deltorphine II, un agoniste sélectif du récepteur opioïdergique delta (DOPR), est maintenue chez des souris déficientes en substance P. Des études de microscopie électronique n'ont pu confirmer si cette augmentation des propriétés analgésiques de la deltorphine II était corrélée avec une augmentation de la densité membranaire de DOPR ou non chez les souris déficientes en substance P. Aussi, en contradiction avec des résultats précédemment publiés (Guan et al., 2005), nous avons observé que l'analgésie induite par la deltorphine II intrathécale est similaire chez les souris déficientes en substance P et sauvages. Nos observations suggèrent donc que la substance P ne serait pas impliquée dans la régulation de DOPR, du moins dans un modèle de douleur inflammatoire induite par le CFA.

6.2 Régulation du récepteur opioïdergique delta par la substance P

Au niveau cellulaire, on retrouve majoritairement DOPR au niveau intracellulaire (Cheng et al., 1995, 1997, Elde et al., 1995, Ji et al., 1995, Zhang et al., 1998, Cahill et al., 2001a). Cette localisation inhabituelle pour un récepteur couplé aux protéines G (RCPG) pourrait expliquer la faible efficacité analgésique des agonistes agissant sur DOPR. Il est cependant possible d'augmenter l'efficacité analgésique de ces agonistes ainsi que la densité membranaire de DOPR de différentes façons (Cahill et al., 2007). Une hypothèse grandement répandue est celle d'une présence de DOPR au niveau intracellulaire, puis de son trafic vers la membrane plasmique neuronale suite à l'exocytose de vésicules intracellulaires. Une augmentation de la densité membranaire de

DOPR a entre autre été montrée suite à une stimulation du récepteur opioïdérique mu (MOPR) (Cahill et al., 2001b, Morinville et al., 2003, 2004a, Hack et al., 2005, Gendron et al., 2006) et dans des modèles de douleur inflammatoire (Cahill et al., 2003, Morinville et al., 2004b, Gendron et al., 2006). Cette augmentation de la densité membranaire de DOPR est corrélée avec une augmentation des propriétés analgésiques des agonistes sélectifs DOPR (Stewart et Hammond, 1994, Fraser et al., 2000, Hurley et Hammond, 2000, Petrillo et al., 2003, Hack et al., 2005). Parmi les mécanismes potentiels de régulation de DOPR (Bie et Pan, 2007, Cahill et al., 2007, Zhang et al., 2010), un rôle pour la substance P a entre autres été proposé (Guan et al., 2005, Julius et Basbaum, 2005, Wang et al., 2010a). En effet, la substance P jouerait un rôle essentiel dans le trafic de DOPR au niveau des neurones des ganglions rachidiens (DRG) de petit diamètre. Il a été proposé que le domaine de la substance P de la préprotachykinine A (PPTA), précurseur de la substance P, interagisse avec DOPR, contrôlant ainsi son insertion dans les vésicules à corps dense (LDCV). En réponse à certains stimuli, ces vésicules sont transportées à la membrane plasmique et libèrent leur contenu en neurotransmetteurs par exocytose (Seward et al., 1995, de Wit, 2010). Les récepteurs delta présents dans ces vésicules seraient alors insérés à la membrane plasmique. Chez des souris déficientes en substance P, le trafic membranaire normal de DOPR est bloqué, entraînant une perte des effets anti-nociceptifs des agonistes DOPR chez ces souris (Guan et al., 2005).

6.3 Rôle de la substance P dans l'inflammation induite par le CFA

Le rôle de la substance P dans la régulation de DOPR n'a cependant pas été étudié dans des modèles de douleur. En utilisant des souris déficientes en substance P (PPTA^{-/-}), notre étude a évalué le rôle de ce neuropeptide dans la régulation de DOPR dans un modèle de douleur inflammatoire induite par le CFA. Dans notre étude, nous avons tout d'abord confirmé que l'inflammation développée chez ces souris n'était pas affectée par l'absence de substance P. Comme préalablement montré par une autre équipe de recherche (Cao et al., 1998), nous n'observons aucune différence entre les souris dans les niveaux d'œdème produits trois jours après l'injection de CFA dans la patte arrière de l'animal. Étant donné le rôle connu de la substance P dans l'inflammation périphérique

(Helke et al., 1990, Woolf et Salter, 2000), on aurait pu s'attendre à une diminution de l'inflammation chez les souris PPTA^{-/-}. Cependant, le CFA produit une inflammation de type non-neurogénique, c'est-à-dire indépendante de l'activité des fibres afférentes primaires (Hylden et al., 1992). Le développement de cette inflammation serait donc indépendant des fibres exprimant la substance P. Par contre, d'autres études ont montrées une augmentation de la relâche de substance P dans la moelle épinière trois jours après une injection de CFA dans la patte (Honor et al., 1999, Willcockson et al., 2010). Les niveaux d'ARNm du gène PPTA semblent aussi augmentés suite à une injection de CFA (Donaldson et al., 1992, Bulling et al., 2001). Néanmoins, le CFA est composé de membranes de bactéries *Mycobacterium butyricum* inactivées suspendues dans une émulsion d'huile et d'eau. Les bactéries contenues dans le CFA vont activer le système immunitaire, permettre le recrutement de macrophages et ainsi provoquer une réaction inflammatoire (Holmdahl et al., 2001, Brunner et al., 2010). Le CFA n'a donc pas une action directe sur les afférences primaires. Il va sans dire que le développement d'une condition inflammatoire pathologique peut ultimement modifier les niveaux de neurotransmetteurs présents dans les afférences primaires (Donaldson et al., 1992, Bulling et al., 2001). Les niveaux d'œdème produits par le CFA sont donc indépendants des fibres exprimant la substance P, expliquant l'absence de différence entre les souris PPTA^{-/-} et sauvages dans nos résultats.

6.4 Co-expression du récepteur opioïdérique delta et de la substance P

Dans les neurones de DRG, la substance P est majoritairement exprimée par des fibres non-myélinisées et de petit diamètre, les fibres C de type peptidergique. On retrouve peu ou pas de substance P dans les fibres A δ et A β (McCarthy et Lawson, 1989). D'un autre côté, DOPR est aussi exprimé par les fibres C et retrouvé dans les neurones de DRG A δ et A β (Dado et al., 1993, Mansour et al., 1994, Ji et al., 1995, Zhang et al., 1998, Wang et Wessendorf, 2001). Il est possible d'augmenter les niveaux membranaires de DOPR dans ces neurones avec certains stimuli. En effet, une activation de MOPR permet une augmentation des niveaux membranaires de DOPR dans les neurones de DRG de tous les diamètres (Gendron et al., 2006). Un modèle de douleur inflammatoire

induite par le CFA permet quant à lui une augmentation des niveaux membranaires de DOPR de façon sélective dans les neurones de DRG de petit et moyen diamètre (Gendron et al., 2006). Ces observations suggèrent donc que différents stimuli permettant d'augmenter la densité membranaire de DOPR vont le faire dans des populations de neurones différents. Cela suggère aussi que l'inflammation par le CFA et le traitement à la morphine influencent le trafic de DOPR dans certains types de neurones n'exprimant pas la substance P. L'hypothèse de notre projet de recherche était donc que dans un modèle de douleur inflammatoire induite par le CFA, la substance P ne serait pas impliquée dans la régulation de DOPR. Pour vérifier cette hypothèse, des souris PPTA^{-/-} ainsi que des souris de types sauvages ont été injectées avec du CFA dans la patte arrière. Trois jours suivant cette injection, les effets antihyperalgésiques de la deltorphine II ont été évalués en réponse à une douleur thermique à l'aide du test plantaire. Les valeurs de ED₅₀ de la deltorphine II indiquent des efficacités antihyperalgésiques similaires chez les souris PPTA^{-/-} et sauvages. Dans un modèle de douleur inflammatoire induite par le CFA, l'absence de substance P ne semble donc pas influencer l'efficacité analgésique d'un agoniste sélectif DOPR.

L'efficacité analgésique d'un agoniste DOPR étant maintenue totalement dans notre modèle, l'interaction proposée entre la substance P et DOPR (Guan et al., 2005) ne serait donc pas valable dans un modèle de douleur inflammatoire induite par le CFA. Logiquement, pour qu'une interaction entre DOPR et la substance P puissent être possible, ils doivent être co-exprimés dans les mêmes neurones, et ultimement dans les mêmes structures cellulaires. Cependant, la co-expression de DOPR et de la substance P dans les mêmes neurones est un sujet controversé. En effet, des agonistes DOPR permettent d'inhiber la relâche de substance P par les fibres afférentes, supportant une localisation de ces récepteurs sur les fibres C exprimant la substance P (Mauborgne et al., 1987, Kondo et al., 2005). De plus, plusieurs études ont montrées la présence de DOPR dans des populations de neurones exprimant la substance P (Dado et al., 1993, Arvidsson et al., 1995, Minami et al., 1995, Zhang et al., 1998, Guan et al., 2005, Riedl et al., 2009, Wang et al., 2010a). La présence de DOPR en périphérie sur des nocicepteurs peptidergiques (qui expriment la substance P) a aussi été démontrée (Joseph et Levine, 2010). Cependant, une étude a récemment montrée que la substance P et DOPR ne

seraient que rarement localisés dans les mêmes neurones (Scherrer et al., 2009). En effet, cette étude propose que DOPR soit majoritairement exprimé par les neurones non-peptidergiques ainsi que les neurones de larges diamètres, tout en étant absent des neurones peptidergiques. Ces résultats ont été obtenus à l'aide de souris *knock-in* pour le récepteur DOPR couplé à la protéine fluorescente GFP (souris DOReGFP) (Scherrer et al., 2006). Les résultats obtenus avec ces souris supportent ceux obtenus dans une étude précédente ne montrant qu'un faible chevauchement entre l'ARNm de DOPR et le marquage immunohistochimique de la substance P (Mennicken et al., 2003). Par contre ils vont à l'encontre de ceux obtenus avec des anticorps ciblant le récepteur DOPR, remettant ainsi en doute la spécificité des anticorps commercialement disponibles (Scherrer et al., 2009) (Figure 7). Cependant, l'ajout d'un tag GFP à une protéine peut influencer son trafic intracellulaire, sa localisation et sa fonctionnalité, comme c'est le cas avec les récepteurs muscanirique M4 (Madziva et Edwardson, 2001), cannabinoïde CB1 (McDonald et al., 2007) et β -adrénergiques (McLean et Milligan, 2000). L'ajout d'un tag GFP modifie aussi la localisation cellulaire de DOPR lorsqu'étudié *in vitro* (Wang et al., 2008, Wang et al., 2010a). La grande taille de la protéine fluorescente GFP (238 acides aminés) (Kallal et Benovic, 2000) pourrait expliquer les modifications de fonctions et localisations engendrées par son ajout à un RCPG (McLean et Milligan, 2000, Wang et al., 2008). La génération de souris dont DOPR a été fusionné avec un tag de plus petite taille, comme myc, hémagglutinine (HA) ou FLAG (Einhauer et Jungbauer, 2001, Terpe, 2003), pourrait être envisagée pour l'étude du récepteur. En effet, *in vitro*, la fonctionnalité et le trafic de DOPR sont peu ou pas influencés par l'ajout de tag moins encombrants (Wang et al., 2008). L'utilisation de DOPR couplé à la protéine GFP ou à un autre tag sont des outils très intéressants pour mieux comprendre le fonctionnement du récepteur. Cependant, il reste essentiel d'utiliser des outils permettant d'étudier la localisation, la fonctionnalité et le trafic des récepteurs retrouvés de façon endogène.

6.5 Techniques alternatives pour localiser le récepteur opioïdergique delta

6.5.1 Ligand fluorescent ω -Bodipy red-[D-Ala²]-deltorphin I

Dans notre étude, nous avons tenté de localiser DOPR au niveau cellulaire suite au traitement avec le CFA chez les souris PPTA^{-/-} et sauvages. En utilisant la microscopie électronique, des coupes de moelles épinières ont été marquées avec un anticorps dirigé contre DOPR. Malheureusement, suite aux résultats obtenus par Scherrer *et al.*, la validité de ces anticorps est quelque peu contestée. Nous avons donc laissé de côté cet aspect de l'étude pour éviter toute controverse avec nos résultats. Cependant, d'autres techniques pourraient être utilisées pour localiser DOPR au niveau cellulaire. En effet, l'utilisation de la deltorphine fluorescente (ω -Bodipy red-[D-Ala²]-deltorphin I) permet de donner un indice sur la densité membranaire du récepteur (Cahill et al., 2001b, Gendron et al., 2006) (Figure 9). Cette technique a été mise au point chez le rat et pourrait, éventuellement, être appliquée à la souris. De cette façon, l'injection de ligand fluorescent permettrait d'évaluer la densité membranaire de DOPR, en fonction des niveaux de fluorescence intracellulaire. Dans notre modèle, la densité membranaire de DOPR pourrait être étudiée avant et après un traitement au CFA chez des souris PPTA^{-/-} et sauvages. De cette façon, l'effet d'une absence de substance P sur le trafic membranaire de DOPR pourrait être évalué.

6.5.2 Marqueurs d'affinité pour le récepteur opioïdergique delta

Des marqueurs d'affinité ont aussi été développés pour DOPR. Les marqueurs d'affinité sont en fait des ligands (agonistes ou antagonistes) capables de créer des interactions covalentes avec un récepteur (Borsodi et Toth, 1995, Portoghese et al., 2001). Ces ligands sont aussi couplés à une sonde radioactive, fluorescente, photosensible ou protéique permettant sa localisation. Le récepteur auquel le marqueur d'affinité se lie pourra alors être reconnu et localisé. Parmi les marqueurs d'affinité développés pour DOPR, on retrouve entre autre l'azido-DTLET, un agoniste DOPR couplé à une sonde photosensible permettant la localisation du ligand suite à sa liaison avec un récepteur dans des tissus (Pasquini et al., 1992). Récemment, un antagoniste pour DOPR, le TIPP, a

été modifié de façon à ce qu'il puisse créer des liaisons covalentes avec DOPR (Aldrich et al., 2009). De plus, ce ligand est couplé à une biotine, permettant ainsi sa localisation à l'aide d'essais immunohistochimiques. Cet outil pourrait être utilisé pour étudier DOPR sans avoir recours à l'utilisation d'anticorps. Le récepteur delta pourrait alors être localisé dans différentes populations de neurones et sa co-localisation possible avec la substance P dans ces neurones pourrait être étudiée avec des anticorps dirigés contre la substance P.

6.5.3 Destruction sélective de fibres afférentes

Toujours dans le but de déterminer la localisation de DOPR et sa possible co-localisation avec la substance P, l'évaluation de l'efficacité analgésique des agonistes DOPR suite à la destruction sélective de fibres C pourrait être réalisée. En effet, il est possible de détruire les fibres C non-peptidergiques en utilisant l'isolectine B4 (IB4)-saporine. L'IB4 reconnaît sélectivement les neurones non-peptidergiques (Bennett et al., 1998), tandis que la saporine est une toxine qui, une fois internalisée par les cellules, interfère avec leur synthèse protéique et les détruit (Mantyh et al., 1997). En couplant, l'IB4 avec la saporine, les neurones non-peptidergiques peuvent alors être détruits (Vulchanova et al., 2001, Joseph et Levine, 2010). Selon différentes études la destruction des neurones exprimant IB4 ne semble pas modifier les seuils de douleur thermique (Cavanaugh et al., 2009). Il serait donc intéressant d'évaluer les effets analgésiques des agonistes DOPR chez des souris traitées ou non avec l'IB4-saporine. Une modification des effets analgésiques donnerait un indice sur la présence de DOPR sur ces neurones, ce qui a déjà été observé (Chen et Pan, 2008, Scherrer et al., 2009, Joseph et Levine, 2010, Wang et al., 2010a). Cependant, les effets analgésiques des agonistes DOPR peuvent aussi être observés au niveau post-synaptique en raison de la localisation de DOPR dans les neurones de la moelle épinière (Besse et al., 1990, Stevens et al., 1991, Dado et al., 1993, Mansour et al., 1994, Arvidsson et al., 1995, Elde et al., 1995, Ji et al., 1995, Zhang et al., 1998, Cahill et al., 2001a, Wang et Wessendorf, 2001, Mennicken et al., 2003, Pradhan et Clarke, 2005). Cette technique ne permettrait donc pas de confirmer la présence de DOPR sur les fibres peptidergiques (fibres exprimant la substance P), mais donnerait des indices sur sa localisation sur les fibres non-peptidergiques.

D'un autre côté, évaluer les effets analgésiques des agonistes DOPR suite à la destruction des fibres afférentes de type peptidergiques pourrait donner plus d'information quant à la co-expression de DOPR et de la substance P dans ces fibres. À ce jour, il n'existe pas de marqueurs des fibres peptidergiques couplés à la saporine, comme par exemple le NGF-saporine. Cet outil pourrait être intéressant pour détruire les fibres afférentes exprimant le récepteur TrkA. Par contre la substance P-saporine (SP-SAP) est disponible, détruisant les neurones exprimant le récepteur NK1 (Mantyh et al., 1997). Il existe des récepteurs NK1 présents sur les neurones de DRG (pré-synaptiques) (von Banchet et Schaible, 1999) et sur les neurones de la moelle épinière (post-synaptique) (Todd, 2002). Une injection de SP-SAP au niveau de la moelle épinière éliminerait donc les neurones présents dans les laminae superficielles et sur les afférences primaires. La destruction sélective des fibres afférentes exprimant la substance P pourrait cependant être envisagée en injectant la SP-SAP en périphérie. En effet, il a été montré qu'une injection d'IB4-saporine dans le nerf sciatique permettait la destruction sélective des fibres non-peptidergiques (Vulchanova et al., 2001). L'IB4 est internalisée au niveau des axones et subit un transport rétrograde jusqu'au corps cellulaires pour détruire la machinerie protéique et le neurone (Vulchanova et al., 2001). Une injection de SP-SAP en périphérie comme décrite pour l'IB4-saporine pourrait aussi permettre à la substance P de lier son récepteur sur les fibres afférentes et de détruire ces neurones. Cet essai permettrait ainsi de détruire sélectivement les fibres afférentes exprimant le récepteur NK1, principalement des fibres peptidergiques exprimant ainsi la substance P (von Banchet et Schaible, 1999). Les effets analgésiques des agonistes DOPR pourraient être évalués en absence et en présence de SP-SAP pour déterminer la contribution de ces fibres dans l'analgésie induite par des agonistes DOPR. Les effets analgésiques DOPR observés en absence de fibres afférentes exprimant la substance P nous renseigneraient sur la possible co-localisation de DOPR avec la substance P.

6.6 Régulation du récepteur opioïdergique delta

Les résultats présentés dans cette étude ne peuvent confirmer ou non la co-expression de la substance P et de DOPR dans les mêmes neurones. Cependant, l'absence de différences dans les effets analgésiques des souris PPTA^{-/-} dans un modèle de douleur inflammatoire nous suggère que l'interaction proposée entre DOPR et la substance P est absente dans notre modèle. Par contre, cette absence d'interaction entre le récepteur et le neuropeptide n'exclut pas la possibilité qu'ils soient exprimés par les mêmes neurones. Il se pourrait aussi que la substance P ne soit pas retrouvée sur les neurones exprimant DOPR comme préalablement proposé (Scherrer et al., 2009). Nos résultats ne peuvent confirmer ces hypothèses. Cependant, il semble clair que la substance P, si elle participe bien à la régulation de DOPR, n'est pas l'unique mécanisme de régulation de DOPR. Il existe donc probablement plus d'un mécanisme responsable de la régulation de DOPR selon les différentes situations.

6.6.1 Maturation du récepteur opioïdergique delta

Parmi les hypothèses de régulation de DOPR, on note que seulement une faible quantité de DOPR nouvellement synthétisés semble quitter le réticulum endoplasmique (RE) sous une forme complète et stable (Petaja-Repo et al., 2000, 2001). Une cinétique de repliement lente pourrait être à l'origine de l'exclusion de DOPR du RE par le contrôle de qualité et à sa dégradation par le protéasome (Petaja-Repo et al., 2000, 2001). Quelques protéines ayant une interaction avec DOPR dans le RE ont été identifiées, comme la calnexine. Cette protéine interagit avec DOPR pour l'aider à atteindre sa maturation et un repliement adéquat (Tuusa et al., 2007, 2010). Malheureusement, la calnexine semble aussi favoriser la dégradation de DOPR avant qu'il n'ait atteint sa conformation désirée (Markkanen et Petaja-Repo, 2008). Pour évaluer le rôle de la calnexine dans la régulation de DOPR, les effets analgésiques des agonistes DOPR pourraient être évalués chez des souris déficiente en calnexine. De cette façon, le rôle de cette protéine dans le repliement et la dégradation de DOPR pourrait être éclairci. Cependant, les souris déficiente en calnexine présentent des problèmes moteurs, d'équilibres et sont plus petites que les souris sauvages (Denzel et al., 2002, Okiyoned et

al., 2008). De plus, ces souris ont une durée de vie limitée (Denzel et al., 2002). L'utilisation de ces souris n'est donc pas envisageable pour tester les effets des agonistes DOPR dans un modèle de douleur.

Des ligands hydrophobiques peuvent favoriser la conformation nécessaire du récepteur dans le RE et ainsi permettre à un plus grand nombre de récepteurs d'atteindre la membrane plasmique (Petaja-Repo et al., 2002). Un traitement avec le naloxone sur des cellules *in vitro* permet d'augmenter le nombre de DOPR (Petaja-Repo et al., 2002) et de MOPR (Chaipatikul et al., 2003) sortant du RE correctement replié. Un traitement chronique au naloxone *in vivo* a aussi été étudié et une augmentation des sites de liaison de DOPR, MOPR et KOPR dans plusieurs régions du cerveau est observée (Morris et al., 1988). Cette augmentation des sites de liaisons opioïdiques est possiblement due à une action de type chaperonne pharmacologique du ligand soluble avec le récepteur dans le RE, stabilisant les récepteurs nouvellement formés (Chen et Liu-Chen, 2009).

6.6.2 Hétérodimères MOPR-DOPR

Un des mécanismes proposés pour la régulation de DOPR est la formation d'hétérodimères entre MOPR et DOPR (MOPR-DOPR) (Cahill et al., 2007). Évidemment, pour qu'une telle interaction soit possible, les récepteurs doivent être exprimés par les mêmes cellules. La co-localisation possible de DOPR et MOPR est aussi un sujet controversé dans la littérature. La co-expression de ces récepteurs a été observée dans les neurones de DRG et de la moelle épinière avec des techniques d'hybridation *in situ* (Wang et Wessendorf, 2001) et d'immunohistochimie (Ji et al., 1995). Des enregistrements électrophysiologiques ont aussi montrés une inhibition de courants calciques par des agonistes DOPR et MOPR sur les mêmes neurones de DRG peptidergiques (Wang et al., 2010a). Les récepteurs mu et delta semblent aussi présents dans une population de neurones exprimant le récepteur TrkA et jouant un rôle dans l'hyperalgésie mécanique (Joseph et Levine, 2010). La co-localisation de DOPR et MOPR a cependant été remise en doute avec l'utilisation de souris DOReGFP (Scherrer et al., 2009). En effet, dans ce modèle DOPR et MOPR sont localisés sur différents neurones de DRG et régissent différents types de douleur (thermique pour MOPR et

mécanique pour DOPR). Malgré les divergences d'opinion quant à la co-expression de MOPR et DOPR dans les mêmes cellules, une interaction dans les effets induits par ces récepteurs est observée. En effet, des études *in vitro* ont montrées une modification des effets des agonistes MOPR ou DOPR dans des cellules exprimant les deux récepteurs (George et al., 2000, Gomes et al., 2000, 2004, Martin et Prather, 2001, Charles et al., 2003, Fan et al., 2005, Hasbi et al., 2007, Rozenfeld et Devi, 2007, Kabli et al., 2010). Chez les animaux, des effets synergiques ont aussi été observés suite à la co-administration d'agonistes MOPR et DOPR tant au niveau central (Jiang et al., 1990, Malmberg et Yaksh, 1992, Adams et al., 1993, Zhang et Pan, 2010) que périphérique (Schramm et Honda, 2010). Un lien proposé entre MOPR et DOPR est la formation d'hétérodimères entre ceux-ci (Gomes et al., 2000, 2004, McVey et al., 2001, Fan et al., 2005, Law et al., 2005, Wang et al., 2005, Hasbi et al., 2007). L'étude des hétérodimères *in vivo* est peu relatée dans la littérature. En fait, une seule étude a pu étudier la formation d'hétérodimères dans les tissus animaux à l'aide d'anticorps sélectifs développés contre les hétérodimères MOPR-DOPR (Gupta et al., 2010). En plus de démontrer la présence d'hétérodimères MOPR-DOPR dans les neurones de DRG et dans certaines zones du cerveau, cette étude a aussi étudiée la formation d'hétérodimères suite à un traitement chronique avec la morphine. Un traitement de 48 heures avec la morphine permet une augmentation des effets analgésiques des agonistes DOPR chez les animaux, via une augmentation des niveaux membranaires de DOPR (Cahill et al., 2001b, Morinville et al., 2003). Suite à un traitement de 48 heures avec la morphine, des anticorps dirigés contre les hétérodimères MOPR-DOPR ont montrés une augmentation de l'immunoréactivité de MOPR-DOPR dans les neurones de la médulla rostro-ventrale (RVM). Chez des neurones de DRG mis en culture, on observe aussi une augmentation de la réactivité des anticorps MOPR-DOPR suite à un traitement de 48 heures avec la morphine. Il semble donc que l'augmentation de la densité membranaire de DOPR et des propriétés analgésiques des agonistes DOPR observée suite à un traitement à la morphine pourrait être dues à une augmentation d'hétérodimères MOPR-DOPR. Il serait intéressant d'évaluer le rôle joué par les hétérodimères MOPR-DOPR dans un modèle de douleur inflammatoire induit par le CFA. Étant donné le rôle important de MOPR dans l'analgésie et la localisation de DOPR observées dans un modèle de douleur

inflammatoire induite par le CFA (Morinville et al., 2004b, Gendron et al., 2007b), la formation d'hétérodimères dans ce modèle serait une hypothèse plausible pour expliquer les effets accrus des agonistes DOPR.

6.6.3 Protéines chaperonnes

Diverses protéines chaperonnes semblent jouer un rôle important dans la régulation du récepteur DOPR. En effet, des rôles pour les protéines RTP-4, SERCA2b, GASP (protéine de triage associée aux récepteurs couplés aux protéines G) et NHERF-1 ont été proposés (Whistler et al., 2002, Decaillot et al., 2008, Bie et al., 2010, Tuusa et al., 2010). Les protéines GASP et NHERF-1 jouent des rôles dans l'avenir de DOPR suite à son internalisation. Le récepteur delta est majoritairement dirigé vers la voie de dégradation par les lysosomes suite à son internalisation (Tsao et von Zastrow, 2000, Chaturvedi et al., 2001, Tanowitz et Von Zastrow, 2002, Whistler et al., 2002). La protéine GASP se lie au récepteur nouvellement internalisé et favorise sa dégradation par les lysosomes (Whistler et al., 2002). Il existe des souris déficientes en GASP. Celles-ci se comportent de façon semblable aux souris sauvages (Boeuf et al., 2009). L'efficacité analgésique des agonistes DOPR, tout comme les niveaux de DOPR pourraient être évalués chez ces souris pour étudier l'impact de la protéine GASP sur la dégradation de DOPR.

D'un autre côté, la protéine NHERF-1 (facteurs de régulation de l'échangeur Na^+/H^+) se lie au récepteur DOPR et favorise son recyclage suite à un traitement à la morphine ou au NGF (Bie et al., 2010). Un traitement à la morphine ou au NGF permet une augmentation de la compétence fonctionnelle de DOPR et du nombre de récepteurs présents à la membrane (Cahill et al., 2001b, Morinville et al., 2003, 2004a, Hack et al., 2005, Gendron et al., 2006, Ma et al., 2006, Bie et al., 2010). Des souris déficientes pour la protéine NHERF-1 ont déjà été utilisées dans la littérature (Shenolikar et al., 2002). Celles-ci sont majoritairement normales au niveau du poids et des comportements, excepté certaines femelles déficientes qui sont plus petites et ont une durée de vie réduite. Ces souris pourraient être utilisées dans des modèles de douleur inflammatoire ou traitées de façon chronique avec la morphine. L'impact de la protéine NHERF-1 sur les effets

analgésiques des agonistes DOPR, ainsi que la densité membranaire de DOPR pourraient alors être évalués. Pour l'instant, il n'existe toujours aucune souris invalidée pour le gène RTP-4. La création de souris semblables pourrait permettre d'étudier en profondeur le rôle de cette protéine dans la régulation des hétérodimères MOPR-DOPR vers la membrane plasmique (Decaillot et al., 2008).

6.7 Dichotomie des effets antinociceptifs et antihyperalgésiques

Les effets antinociceptifs et antihyperalgésiques des agonistes DOPR peuvent varier. En effet, les effets antinociceptifs de la deltorphine II intrathécale obtenus à l'aide du test d'immersion de la queue dans l'eau chaude, diminuent grandement suite à des injections répétées d'agonistes (Beaudry et al., 2009). D'un autre côté, les effets antihyperalgésiques de la deltorphine II intrathécale obtenus à l'aide du test plantaire, demeurent constants suite à l'injection répétée d'agoniste, montrant ainsi une différence dans le développement de la tolérance face aux effets antinociceptifs et antihyperalgésiques de la deltorphine II (Beaudry et al., 2009). Les effets antinociceptifs et antihyperalgésiques de la deltorphine II intrathécale varient aussi suite à un traitement à la morphine chez les souris dans un modèle de douleur inflammatoire induite par le CFA (Gendron et al., 2007a). En effet, dans ce modèle les effets antihyperalgésiques (test plantaire) de la deltorphine II sont augmentés, tandis que les effets antinociceptifs (test d'immersion de la queue dans l'eau chaude) sont diminués. Il semble donc y avoir une dichotomie entre les effets antinociceptifs et antihyperalgésiques des agonistes DOPR. Pour caractériser ces différences, nous avons évalué les effets antinociceptifs de la deltorphine II intrathécale chez les souris PPTA^{-/-} et sauvages dans le test d'immersion de la queue dans l'eau chaude, à 52°C.

Suite à l'injection intrathécale de deltorphine II, les effets antinociceptifs observés chez les souris PPTA^{-/-} et sauvages ne varient pas. En effet, aux différentes doses testées, l'analgésie induite par la deltorphine II est semblable entre les génotypes. Nos résultats vont à l'encontre de ceux obtenus par Guan et ses collaborateurs (Guan et al., 2005). La différence au niveau des résultats peut être expliquée par des différences dans les lignées de souris utilisées. Nous avons utilisé des souris PPTA^{-/-} générées par Cao et ses

collaborateurs (Cao et al., 1998) avec l'exception que nos souris ont été croisées au moins dix fois avec des souris C57Bl/6. D'un autre côté, Guan et ses collaborateurs ont utilisés les souris déficientes en substance P décrites par l'équipe de Zimmer (Zimmer et al., 1998). Ces deux types de souris n'expriment ni la substance P ni la neurokinine A (une autre tachykinine), mais ont été générées à partir de lignées de souris différentes. En effet, les souris obtenues par Cao et ses collaborateurs ont été générées à partir de souris CD-1, puis reproduites avec des souris C57Bl/6, tandis que celles de Zimmer et ses collaborateurs ont été obtenues à partir de souris 129SV et par la suite reproduites avec des souris C57Bl/6. Ces différences dans la descendance génétique des souris pourraient possiblement expliquer les différences obtenues dans le test d'immersion de la queue dans l'eau chaude. En plus d'être générées à partir de lignées différentes, les deux types de souris déficientes en substance P présentent des différences dans leurs comportements face à divers stimuli douloureux. En effet, chez les souris de Zimmer et ses collaborateurs on note une diminution de la sensibilité à la formaline, mais aucune modification des réactions causées par une injection d'acide acétique au niveau abdominal (Zimmer et al., 1998). Les souris développées par Cao et ses collaborateurs présentent quant à elles une diminution de la sensibilité face à une injection d'acide acétique au niveau abdominal, mais aucune modification de son comportement en réponse à une injection de formaline (Cao et al., 1998). De plus, une étude récente a montrée que le phénotype des souris 129SV x C57Bl/6 (Zimmer et al., 1998) est modifié après plusieurs croisements avec des souris C57Bl/6 (Bilkei-Gorzo et al., 2010). Plus il y a de croisements, plus le phénotype des souris 129SV face à des stimuli nociceptifs semble se perdre. Cette modification de phénotype dans la même colonie de souris pourrait expliquer les différences obtenues entre notre étude et celle de Guan et ses collaborateurs. De plus, des différences dans les comportements face à divers stimuli douloureux ont été observées entre certaines lignées de souris, comme les souris C57Bl/6 et 129SV (Mogil et al., 1999, Lariviere et al., 2001). Malgré les différences de phénotype entre les différentes lignées de souris, l'absence de substance P est commune dans toutes ces lignées. Nos observations suggèrent donc que la substance P ne serait pas essentielle pour que DOPR soit pleinement fonctionnel et que le trafic du récepteur ne serait, lui aussi, pas affecté par une absence de substance P.

6.8 Génération de la douleur thermique et mécanique

6.8.1 Rôle de la substance P

Dans les deux tests utilisés dans notre étude, les mêmes seuils de douleur face aux stimuli thermiques ont été mesurés chez les souris déficientes en substance P et celles de types sauvages. Des résultats similaires ont préalablement été observés (Cao et al., 1998, Zimmer et al., 1998, Guan et al., 2005). Cependant, étant donné que les neurones exprimant la substance P sont activés à 52°C (Abbadie et al., 1997, King et al., 2005), une différence dans les seuils de douleur observés entre les souris aurait été attendue. La substance P et la neurokinine A semblent aussi contribuer de façon plus importante à la transmission d'information nociceptive thermique que mécanique dans les neurones de la lamina I (Mazario et Basbaum, 2007). D'un autre côté, des stimuli mécaniques vont permettre une relâche de substance P plus importante que des stimuli thermiques (Zachariou et Goldstein, 1996, Abbadie et al., 1997). Néanmoins, la douleur mécanique n'induit pas de modifications comportementales chez les souris déficientes en substance P (Cao et al., 1998) ou déficientes en récepteurs NK1, récepteur de la substance P, (De Felipe et al., 1998) en comparaison avec des souris de type sauvages. Étant donné la co-localisation de la substance P avec d'autres neuropeptides comme le CGRP (Merighi et al., 1988, Salio et al., 2007), ceux-ci pourraient compenser pour l'absence de substance P dans la transmission nociceptive chez ces souris.

6.8.2 Rôle du récepteur opioïdergique delta

Récemment, l'étude de Scherrer *et al.* a proposée que l'analgésie via DOPR ne soit associé qu'à des douleurs mécaniques et qu'il n'y ait aucun impact sur les douleurs thermiques (qui seraient plutôt associées à MOPR) (Scherrer et al., 2009). L'analgésie avec des agonistes DOPR en réponse à une douleur thermique préalablement observée dans la littérature (Cahill et al., 2001b, Cahill et al., 2003, Morinville et al., 2003, Gendron et al., 2007b) se ferait via une action des agonistes DOPR sur MOPR (Scherrer et al., 2004, Scherrer et al., 2009). Nos résultats démontrent cependant qu'un agoniste DOPR peut être efficace pour diminuer la douleur thermique chez les souris. En utilisant

de faibles doses de naltrindole (antagoniste sélectif de DOPR) injectées de façon intrathécale, nous avons confirmé l'action de la deltorphine II via DOPR, confirmant ce qui avait été préalablement démontré (Gendron et al., 2007b). Les agonistes DOPR peuvent aussi être efficaces pour réduire la douleur induite par un stimulus mécanique (Chen et Pan, 2008, Scherrer et al., 2009, Joseph et Levine, 2010). Il serait donc intéressant de vérifier l'efficacité des analgésiques DOPR face à une douleur mécanique dans un modèle de douleur inflammatoire induite par le CFA chez nos deux types de souris. De cette façon, le rôle de la substance P dans la régulation des effets analgésiques DOPR pourrait être étudié en réponse à un stimulus mécanique (proposé comme étant contrôlé par DOPR (Scherrer et al., 2009)).

7 Conclusion

Malgré la possibilité que DOPR et la substance P soit co-exprimés dans les mêmes neurones, les résultats de ce mémoire suggèrent qu'une interaction entre ceux-ci ne serait pas responsable de la régulation de DOPR dans un modèle de douleur inflammatoire induite par l'adjuvant complet de Freund (CFA). Chez les souris PPTA^{-/-}, l'absence de substance P n'influence pas l'efficacité antihyperalgésique d'un agoniste sélectif DOPR dans le modèle CFA. De plus, les effets antinociceptifs d'un agoniste DOPR sont maintenus chez ces souris. Dans l'ensemble, à l'opposé de ce qui avait été préalablement proposé (Guan et al., 2005), la régulation de DOPR semble se faire de façon indépendante de la substance P. Un rôle pour MOPR a déjà été proposé pour la régulation de DOPR et pourrait être une avenue de recherche intéressante dans l'étude de la régulation de DOPR.

8 Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier mon directeur de recherche, le Pr. Louis Gendron pour m'avoir accueilli dans son laboratoire depuis le début. En effet, j'ai eu la chance de réaliser différents stages dans le laboratoire lors de mon baccalauréat, avant le début de ma maîtrise. Merci Louis de m'avoir donné ma première chance dans un nouveau laboratoire. L'expérience acquise lors de mes stages m'a été d'une grande aide lors de mes études graduées. Merci d'avoir toujours été disponible à travers les années, malgré ta charge de travail grandissante. Ta curiosité scientifique est contagieuse, ce qui nous amène toujours à repousser nos limites. Merci aussi pour les différents échanges scientifiques lors desquels j'ai énormément appris et qui m'ont permis de me rendre où je suis aujourd'hui.

Je tiens aussi à remercier les membres du laboratoire avec qui j'ai eu la chance de partager contenu scientifique et non-scientifique sur une base quotidienne lors des dernières années. Merci Hélène, pour avoir été toujours présente pour répondre à mes nombreuses questions. Ton talent pour expliquer et enseigner les différents concepts est encore plus utile et apprécié que tu ne puisses l'imaginer. Un merci aussi à Valérie et Véronique avec qui j'ai partagé de nombreux échanges scientifiques sur les détails qui constituent la vie au jour le jour dans un laboratoire. J'ai grandement appris grâce à vous. Je tiens aussi à remercier les autres membres du laboratoire : Alex, Arnaud, Audrey, Kristina et Julie. Merci à tous d'avoir contribué à rendre l'environnement de travail un endroit enrichissant. Surtout, je tiens à tous vous remercier pour les aspects non-scientifiques. Les études graduées sont tellement plus simples et agréables quand on fait partie d'une aussi belle équipe.

Merci à ma famille, pour avoir été présents tout au long de mes études. Principalement à mes parents, André et Francine, pour avoir toujours été intéressés par mes travaux, même si c'était loin d'être votre champ d'expertise. Merci de m'avoir toujours encouragé à persévérer au cours des années. Merci à ma sœur Julie d'être toujours là pour moi et de m'encourager, peu importe la situation.

Puisque la vie ne se résume pas seulement au travail et aux études, je tiens à remercier certains de mes amis pour présence aux cours des dernières années. Plus particulièrement, je veux remercier Mandy et Pierre-Yves pour avoir toujours été présents pour échanger sur les bons coups et les malchances quotidiennes que constitue la recherche. Je me sens privilégié de vous avoir côtoyés au cours de mes années universitaires. Je tiens aussi à remercier Maxime, Marie-Pier, David et Jean-Pascal, pour ne nommer qu'eux. Merci pour l'intérêt que vous avez porté à mes projets. Merci d'avoir partagé mes passions musicales et sportives avec vous, en espérant poursuivre pour de nombreuses années. Votre soutien et vos encouragements constants m'ont aidé plus que vous ne pouvez l'imaginer lors de la réalisation de ce travail.

Finalement, merci aux Pr. Louis Gendron, Philippe Sarret et Philippe Goffaux pour le temps précieux que vous avez accepté d'allouer à la lecture et correction de mon travail.

9 Liste des publications

- Abbadie, C., Trafton, J., Liu, H., Mantyh, P.W. et Basbaum, A.I. (1997) Inflammation increases the distribution of dorsal horn neurons that internalize the neurokinin-1 receptor in response to noxious and non-noxious stimulation. *J Neurosci*, **17**, 8049-8060.
- Adams, J.U., Tallarida, R.J., Geller, E.B. et Adler, M.W. (1993) Isobolographic superadditivity between delta and mu opioid agonists in the rat depends on the ratio of compounds, the mu agonist and the analgesic assay used. *J Pharmacol Exp Ther*, **266**, 1261-1267.
- Aldrich, J.V., Kumar, V., Murray, T.F., Guang, W. et Wang, J.B. (2009) Dual labeled peptides as tools to study receptors: nanomolar affinity derivatives of TIPP (Tyr-Tic-Phe-Phe) containing an affinity label and biotin as probes of delta opioid receptors. *Bioconjug Chem*, **20**, 201-204.
- Amaya, F., Oh-hashii, K., Naruse, Y., Iijima, N., Ueda, M., Shimosato, G., Tominaga, M., Tanaka, Y. et Tanaka, M. (2003) Local inflammation increases vanilloid receptor 1 expression within distinct subgroups of DRG neurons. *Brain Res*, **963**, 190-196.
- Arttamangkul, S., Alvarez-Maubecin, V., Thomas, G., Williams, J.T. et Grandy, D.K. (2000) Binding and internalization of fluorescent opioid peptide conjugates in living cells. *Mol Pharmacol*, **58**, 1570-1580.
- Arvidsson, U., Dado, R.J., Riedl, M., Lee, J.H., Law, P.Y., Loh, H.H., Elde, R. et Wessendorf, M.W. (1995) delta-Opioid receptor immunoreactivity: distribution in brainstem and spinal cord, and relationship to biogenic amines and enkephalin. *J Neurosci*, **15**, 1215-1235.
- Averill, S., McMahon, S.B., Clary, D.O., Reichardt, L.F. et Priestley, J.V. (1995) Immunocytochemical localization of trkA receptors in chemically identified subgroups of adult rat sensory neurons. *Eur J Neurosci*, **7**, 1484-1494.
- Bao, L., Jin, S.X., Zhang, C., Wang, L.H., Xu, Z.Z., Zhang, F.X., Wang, L.C., Ning, F.S., Cai, H.J., Guan, J.S., Xiao, H.S., Xu, Z.Q., He, C., Hokfelt, T., Zhou, Z. et Zhang, X. (2003) Activation of delta opioid receptors induces receptor insertion and neuropeptide secretion. *Neuron*, **37**, 121-133.
- Basbaum, A.I., Bautista, D.M., Scherrer, G. et Julius, D. (2009) Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell*, **139**, 267-284.

- Beaudry, H., Proteau-Gagne, A., Li, S., Dory, Y., Chavkin, C. et Gendron, L. (2009) Differential noxious and motor tolerance of chronic delta opioid receptor agonists in rodents. *Neuroscience*, **161**, 381-391.
- Behrens, M., Bartelt, J., Reichling, C., Winnig, M., Kuhn, C. et Meyerhof, W. (2006) Members of RTP and REEP gene families influence functional bitter taste receptor expression. *J Biol Chem*, **281**, 20650-20659.
- Bennett, D.B., Spain, J.W., Laskowski, M.B., Roth, B.L. et Coscia, C.J. (1985) Stereospecific opiate-binding sites occur in coated vesicles. *J Neurosci*, **5**, 3010-3015.
- Bennett, D.L., Michael, G.J., Ramachandran, N., Munson, J.B., Averill, S., Yan, Q., McMahon, S.B. et Priestley, J.V. (1998) A distinct subgroup of small DRG cells express GDNF receptor components and GDNF is protective for these neurons after nerve injury. *J Neurosci*, **18**, 3059-3072.
- Besse, D., Lombard, M.C., Perrot, S. et Besson, J.M. (1992) Regulation of opioid binding sites in the superficial dorsal horn of the rat spinal cord following loose ligation of the sciatic nerve: comparison with sciatic nerve section and lumbar dorsal rhizotomy. *Neuroscience*, **50**, 921-933.
- Besse, D., Lombard, M.C., Zajac, J.M., Roques, B.P. et Besson, J.M. (1990) Pre- and postsynaptic distribution of mu, delta and kappa opioid receptors in the superficial layers of the cervical dorsal horn of the rat spinal cord. *Brain Res*, **521**, 15-22.
- Bie, B. et Pan, Z.Z. (2007) Trafficking of central opioid receptors and descending pain inhibition. *Mol Pain*, **3**, 37.
- Bie, B., Zhang, Z., Cai, Y.Q., Zhu, W., Zhang, Y., Dai, J., Lowenstein, C.J., Weinman, E.J. et Pan, Z.Z. (2010) Nerve growth factor-regulated emergence of functional delta-opioid receptors. *J Neurosci*, **30**, 5617-5628.
- Bilkei-Gorzo, A., Berner, J., Zimmermann, J., Wickstrom, R., Racz, I. et Zimmer, A. (2010) Increased morphine analgesia and reduced side effects in mice lacking the *tac1* gene. *Br J Pharmacol*, **160**, 1443-1452.
- Bilsky, E.J., Calderon, S.N., Wang, T., Bernstein, R.N., Davis, P., Hruby, V.J., McNutt, R.W., Rothman, R.B., Rice, K.C. et Porreca, F. (1995) SNC 80, a selective, nonpeptidic and systemically active opioid delta agonist. *J Pharmacol Exp Ther*, **273**, 359-366.
- Boeuf, J., Trigo, J.M., Moreau, P.H., Lecourtier, L., Vogel, E., Cassel, J.C., Mathis, C., Klosien, P., Maldonado, R. et Simonin, F. (2009) Attenuated behavioural responses to acute and chronic cocaine in GASP-1-deficient mice. *Eur J Neurosci*, **30**, 860-868.

- Borsodi, A. et Toth, G. (1995) Characterization of opioid receptor types and subtypes with new ligands. *Ann N Y Acad Sci*, **757**, 339-352.
- Brady, A.E. et Limbird, L.E. (2002) G protein-coupled receptor interacting proteins: emerging roles in localization and signal transduction. *Cell Signal*, **14**, 297-309.
- Brake, A., Schumacher, M. et Julius, D. (1996) ATP receptors in sickness, pain and death. *Chem Biol*, **3**, 229-232.
- Brandt, M.R., Furness, M.S., Rice, K.C., Fischer, B.D. et Negus, S.S. (2001) Studies of tolerance and dependence with the delta-opioid agonist SNC80 in rhesus monkeys responding under a schedule of food presentation. *J Pharmacol Exp Ther*, **299**, 629-637.
- Braz, J.M. et Basbaum, A.I. (2009) Triggering genetically-expressed transneuronal tracers by peripheral axotomy reveals convergent and segregated sensory neuron-spinal cord connectivity. *Neuroscience*, **163**, 1220-1232.
- Braz, J.M., Nassar, M.A., Wood, J.N. et Basbaum, A.I. (2005) Parallel "pain" pathways arise from subpopulations of primary afferent nociceptor. *Neuron*, **47**, 787-793.
- Breivik, H. (2001) Opioids in cancer and chronic non-cancer pain therapy-indications and controversies. *Acta Anaesthesiol Scand*, **45**, 1059-1066.
- Brunner, R., Jensen-Jarolim, E. et Pali-Scholl, I. (2010) The ABC of clinical and experimental adjuvants--a brief overview. *Immunol Lett*, **128**, 29-35.
- Bulenger, S., Marullo, S. et Bouvier, M. (2005) Emerging role of homo- and heterodimerization in G-protein-coupled receptor biosynthesis and maturation. *Trends Pharmacol Sci*, **26**, 131-137.
- Bulling, D.G., Kelly, D., Bond, S., McQueen, D.S. et Seckl, J.R. (2001) Adjuvant-induced joint inflammation causes very rapid transcription of beta-preprotachykinin and alpha-CGRP genes in innervating sensory ganglia. *J Neurochem*, **77**, 372-382.
- Cahill, C.M., Holdridge, S.V. et Morinville, A. (2007) Trafficking of delta-opioid receptors and other G-protein-coupled receptors: implications for pain and analgesia. *Trends Pharmacol Sci*, **28**, 23-31.
- Cahill, C.M., McClellan, K.A., Morinville, A., Hoffert, C., Hubatsch, D., O'Donnell, D. et Beaudet, A. (2001a) Immunohistochemical distribution of delta opioid receptors in the rat central nervous system: evidence for somatodendritic labeling and antigen-specific cellular compartmentalization. *J Comp Neurol*, **440**, 65-84.

- Cahill, C.M., Morinville, A., Hoffert, C., O'Donnell, D. et Beaudet, A. (2003) Up-regulation and trafficking of delta opioid receptor in a model of chronic inflammation: implications for pain control. *Pain*, **101**, 199-208.
- Cahill, C.M., Morinville, A., Lee, M.C., Vincent, J.P., Collier, B. et Beaudet, A. (2001b) Prolonged morphine treatment targets delta opioid receptors to neuronal plasma membranes and enhances delta-mediated antinociception. *J Neurosci*, **21**, 7598-7607.
- Calderon, S.N. et Coop, A. (2004) SNC 80 and related delta opioid agonists. *Curr Pharm Des*, **10**, 733-742.
- Calixto, J.B., Cabrini, D.A., Ferreira, J. et Campos, M.M. (2000) Kinins in pain and inflammation. *Pain*, **87**, 1-5.
- Cao, T.T., Deacon, H.W., Reczek, D., Bretscher, A. et von Zastrow, M. (1999) A kinase-regulated PDZ-domain interaction controls endocytic sorting of the beta2-adrenergic receptor. *Nature*, **401**, 286-290.
- Cao, Y.Q., Mantyh, P.W., Carlson, E.J., Gillespie, A.M., Epstein, C.J. et Basbaum, A.I. (1998) Primary afferent tachykinins are required to experience moderate to intense pain. *Nature*, **392**, 390-394.
- Caterina, M.J., Schumacher, M.A., Tominaga, M., Rosen, T.A., Levine, J.D. et Julius, D. (1997) The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*, **389**, 816-824.
- Cavanaugh, D.J., Lee, H., Lo, L., Shields, S.D., Zylka, M.J., Basbaum, A.I. et Anderson, D.J. (2009) Distinct subsets of unmyelinated primary sensory fibers mediate behavioral responses to noxious thermal and mechanical stimuli. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**, 9075-9080.
- Cen, B., Yu, Q., Guo, J., Wu, Y., Ling, K., Cheng, Z., Ma, L. et Pei, G. (2001) Direct binding of beta-arrestins to two distinct intracellular domains of the delta opioid receptor. *J Neurochem*, **76**, 1887-1894.
- Chaipatikul, V., Erickson-Herbrandson, L.J., Loh, H.H. et Law, P.Y. (2003) Rescuing the traffic-deficient mutants of rat mu-opioid receptors with hydrophobic ligands. *Mol Pharmacol*, **64**, 32-41.
- Charles, A.C., Mostovskaya, N., Asas, K., Evans, C.J., Dankovich, M.L. et Hales, T.G. (2003) Coexpression of delta-opioid receptors with micro receptors in GH3 cells changes the functional response to micro agonists from inhibitory to excitatory. *Mol Pharmacol*, **63**, 89-95.

- Chaturvedi, K., Bandari, P., Chinen, N. et Howells, R.D. (2001) Proteasome involvement in agonist-induced down-regulation of mu and delta opioid receptors. *J Biol Chem*, **276**, 12345-12355.
- Chen, S.R. et Pan, H.L. (2008) Removing TRPV1-expressing primary afferent neurons potentiates the spinal analgesic effect of delta-opioid agonists on mechanonociception. *Neuropharmacology*, **55**, 215-222.
- Chen, Y. et Liu-Chen, L.Y. (2009) Chaperone-like effects of cell-permeant ligands on opioid receptors. *Front Biosci*, **14**, 634-643.
- Chen, Y., Mestek, A., Liu, J. et Yu, L. (1993) Molecular cloning of a rat kappa opioid receptor reveals sequence similarities to the mu and delta opioid receptors. *Biochem J*, **295** (Pt 3), 625-628.
- Chen, Y.L., Law, P.Y. et Loh, H.H. (2006) Sustained activation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/nuclear factor kappaB signaling mediates G protein-coupled delta-opioid receptor gene expression. *J Biol Chem*, **281**, 3067-3074.
- Cheng, P.Y., Liu-Chen, L.Y. et Pickel, V.M. (1997) Dual ultrastructural immunocytochemical labeling of mu and delta opioid receptors in the superficial layers of the rat cervical spinal cord. *Brain Res*, **778**, 367-380.
- Cheng, P.Y., Svingos, A.L., Wang, H., Clarke, C.L., Jenab, S., Beczkowska, I.W., Inturrisi, C.E. et Pickel, V.M. (1995) Ultrastructural immunolabeling shows prominent presynaptic vesicular localization of delta-opioid receptor within both enkephalin- and nonenkephalin-containing axon terminals in the superficial layers of the rat cervical spinal cord. *J Neurosci*, **15**, 5976-5988.
- Cheng, Z.J., Yu, Q.M., Wu, Y.L., Ma, L. et Pei, G. (1998) Selective interference of beta-arrestin 1 with kappa and delta but not mu opioid receptor/G protein coupling. *J Biol Chem*, **273**, 24328-24333.
- Chieng, B. et Christie, M.J. (2009) Chronic morphine treatment induces functional delta-opioid receptors in amygdala neurons that project to periaqueductal grey. *Neuropharmacology*, **57**, 430-437.
- Chu, P., Murray, S., Lissin, D. et von Zastrow, M. (1997) Delta and kappa opioid receptors are differentially regulated by dynamin-dependent endocytosis when activated by the same alkaloid agonist. *J Biol Chem*, **272**, 27124-27130.
- Codd, E.E., Carson, J.R., Colburn, R.W., Stone, D.J., Van Besien, C.R., Zhang, S.P., Wade, P.R., Gallantine, E.L., Meert, T.F., Molino, L., Pullan, S., Razler, C.M., Dax, S.L. et Flores, C.M. (2009) JNJ-20788560 [9-(8-azabicyclo[3.2.1]oct-3-ylidene)-9H-xanthene-3-carboxylic acid diethylamide], a selective delta opioid receptor agonist, is a potent and efficacious antihyperalgesic agent that does not

- produce respiratory depression, pharmacologic tolerance, or physical dependence. *J Pharmacol Exp Ther*, **329**, 241-251.
- Colpaert, F.C. (1996) System theory of pain and of opiate analgesia: no tolerance to opiates. *Pharmacol Rev*, **48**, 355-402.
- Commons, K.G. (2003) Translocation of presynaptic delta opioid receptors in the ventrolateral periaqueductal gray after swim stress. *J Comp Neurol*, **464**, 197-207.
- Commons, K.G., Beck, S.G., Rudoy, C. et Van Bockstaele, E.J. (2001) Anatomical evidence for presynaptic modulation by the delta opioid receptor in the ventrolateral periaqueductal gray of the rat. *J Comp Neurol*, **430**, 200-208.
- Costa, T., Wuster, M., Gramsch, C. et Herz, A. (1985) Multiple states of opioid receptors may modulate adenylate cyclase in intact neuroblastoma X glioma hybrid cells. *Mol Pharmacol*, **28**, 146-154.
- Cowan, A., Zhu, X.Z., Mosberg, H.I., Omnaas, J.R. et Porreca, F. (1988) Direct dependence studies in rats with agents selective for different types of opioid receptor. *J Pharmacol Exp Ther*, **246**, 950-955.
- Cvejic, S. et Devi, L.A. (1997) Dimerization of the delta opioid receptor: implication for a role in receptor internalization. *J Biol Chem*, **272**, 26959-26964.
- Dado, R.J., Law, P.Y., Loh, H.H. et Elde, R. (1993) Immunofluorescent identification of a delta (delta)-opioid receptor on primary afferent nerve terminals. *Neuroreport*, **5**, 341-344.
- De Felipe, C., Herrero, J.F., O'Brien, J.A., Palmer, J.A., Doyle, C.A., Smith, A.J., Laird, J.M., Belmonte, C., Cervero, F. et Hunt, S.P. (1998) Altered nociception, analgesia and aggression in mice lacking the receptor for substance P. *Nature*, **392**, 394-397.
- de Wit, H. (2010) Morphological docking of secretory vesicles. *Histochem Cell Biol*, **134**, 103-113.
- Decaillot, F.M., Rozenfeld, R., Gupta, A. et Devi, L.A. (2008) Cell surface targeting of mu-delta opioid receptor heterodimers by RTP4. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 16045-16050.
- Denzel, A., Molinari, M., Trigueros, C., Martin, J.E., Velmurgan, S., Brown, S., Stamp, G. et Owen, M.J. (2002) Early postnatal death and motor disorders in mice congenitally deficient in calnexin expression. *Mol Cell Biol*, **22**, 7398-7404.

- Desmeules, J.A., Kayser, V. et Guilbaud, G. (1993) Selective opioid receptor agonists modulate mechanical allodynia in an animal model of neuropathic pain. *Pain*, **53**, 277-285.
- Doly, S., Fischer, J., Brisorgueil, M.J., Verge, D. et Conrath, M. (2004) 5-HT_{5A} receptor localization in the rat spinal cord suggests a role in nociception and control of pelvic floor musculature. *J Comp Neurol*, **476**, 316-329.
- Doly, S., Fischer, J., Brisorgueil, M.J., Verge, D. et Conrath, M. (2005) Pre- and postsynaptic localization of the 5-HT₇ receptor in rat dorsal spinal cord: immunocytochemical evidence. *J Comp Neurol*, **490**, 256-269.
- Donaldson, L.F., Harmar, A.J., McQueen, D.S. et Seckl, J.R. (1992) Increased expression of preprotachykinin, calcitonin gene-related peptide, but not vasoactive intestinal peptide messenger RNA in dorsal root ganglia during the development of adjuvant monoarthritis in the rat. *Brain Res Mol Brain Res*, **16**, 143-149.
- Drake, M.T., Shenoy, S.K. et Lefkowitz, R.J. (2006) Trafficking of G protein-coupled receptors. *Circ Res*, **99**, 570-582.
- Dubois, D. et Gendron, L. (2010) Delta opioid receptor-mediated analgesia is not altered in preprotachykinin A knockout mice. *Eur J Neurosci*, **32**, 1921-1929.
- Einhauer, A. et Jungbauer, A. (2001) The FLAG peptide, a versatile fusion tag for the purification of recombinant proteins. *J Biochem Biophys Methods*, **49**, 455-465.
- Eisinger, D.A. et Ammer, H. (2008) delta-Opioid receptors stimulate ERK1/2 activity in NG108-15 hybrid cells by integrin-mediated transactivation of TrkA receptors. *FEBS Lett*, **582**, 3325-3329.
- Eisinger, D.A. et Schulz, R. (2005) Mechanism and consequences of delta-opioid receptor internalization. *Crit Rev Neurobiol*, **17**, 1-26.
- Elde, R., Arvidsson, U., Riedl, M., Vulchanova, L., Lee, J.H., Dado, R., Nakano, A., Chakrabarti, S., Zhang, X., Loh, H.H., Law, P.Y., Hokfelt, T. et Wessendorf, M.W. (1995) Distribution of neuropeptide receptors. New views of peptidergic neurotransmission made possible by antibodies to opioid receptors. *Ann N Y Acad Sci*, **757**, 390-404.
- Ellgaard, L. et Helenius, A. (2003) Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **4**, 181-191.
- Evans, C.J., Keith, D.E., Jr., Morrison, H., Magendzo, K. et Edwards, R.H. (1992) Cloning of a delta opioid receptor by functional expression. *Science*, **258**, 1952-1955.

- Fan, T., Varghese, G., Nguyen, T., Tse, R., O'Dowd, B.F. et George, S.R. (2005) A role for the distal carboxyl tails in generating the novel pharmacology and G protein activation profile of mu and delta opioid receptor hetero-oligomers. *J Biol Chem*, **280**, 38478-38488.
- Filizola, M., Olmea, O. et Weinstein, H. (2002) Prediction of heterodimerization interfaces of G-protein coupled receptors with a new subtractive correlated mutation method. *Protein Eng*, **15**, 881-885.
- Fraser, G.L., Gaudreau, G.A., Clarke, P.B., Menard, D.P. et Perkins, M.N. (2000) Antihyperalgesic effects of delta opioid agonists in a rat model of chronic inflammation. *Br J Pharmacol*, **129**, 1668-1672.
- Gallantine, E.L. et Meert, T.F. (2005) A comparison of the antinociceptive and adverse effects of the mu-opioid agonist morphine and the delta-opioid agonist SNC80. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, **97**, 39-51.
- Gaveriaux-Ruff, C. (2009) Le récepteur opioïde delta : une nouvelle cible thérapeutique pour la douleur mais plus encore... *Douleur Analgésique*, **22**, 1-9.
- Gendron, L., Esdaile, M.J., Mennicken, F., Pan, H., O'Donnell, D., Vincent, J.P., Devi, L.A., Cahill, C.M., Stroh, T. et Beaudet, A. (2007a) Morphine priming in rats with chronic inflammation reveals a dichotomy between antihyperalgesic and antinociceptive properties of deltorphin. *Neuroscience*, **144**, 263-274.
- Gendron, L., Lucido, A.L., Mennicken, F., O'Donnell, D., Vincent, J.P., Stroh, T. et Beaudet, A. (2006) Morphine and pain-related stimuli enhance cell surface availability of somatic delta-opioid receptors in rat dorsal root ganglia. *J Neurosci*, **26**, 953-962.
- Gendron, L., Pintar, J.E. et Chavkin, C. (2007b) Essential role of mu opioid receptor in the regulation of delta opioid receptor-mediated antihyperalgesia. *Neuroscience*, **150**, 807-817.
- George, S.R., Fan, T., Xie, Z., Tse, R., Tam, V., Varghese, G. et O'Dowd, B.F. (2000) Oligomerization of mu- and delta-opioid receptors. Generation of novel functional properties. *J Biol Chem*, **275**, 26128-26135.
- George, S.R., O'Dowd, B.F. et Lee, S.P. (2002) G-protein-coupled receptor oligomerization and its potential for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*, **1**, 808-820.
- Gomes, I., Gupta, A., Filipovska, J., Szeto, H.H., Pintar, J.E. et Devi, L.A. (2004) A role for heterodimerization of mu and delta opiate receptors in enhancing morphine analgesia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 5135-5139.

- Gomes, I., Jordan, B.A., Gupta, A., Trapaidze, N., Nagy, V. et Devi, L.A. (2000) Heterodimerization of mu and delta opioid receptors: A role in opiate synergy. *J Neurosci*, **20**, RC110.
- Griffiths, G. et Simons, K. (1986) The trans Golgi network: sorting at the exit site of the Golgi complex. *Science*, **234**, 438-443.
- Guan, J.S., Xu, Z.Z., Gao, H., He, S.Q., Ma, G.Q., Sun, T., Wang, L.H., Zhang, Z.N., Lena, I., Kitchen, I., Elde, R., Zimmer, A., He, C., Pei, G., Bao, L. et Zhang, X. (2005) Interaction with vesicle luminal protachykinin regulates surface expression of delta-opioid receptors and opioid analgesia. *Cell*, **122**, 619-631.
- Guo, A., Vulchanova, L., Wang, J., Li, X. et Elde, R. (1999) Immunocytochemical localization of the vanilloid receptor 1 (VR1): relationship to neuropeptides, the P2X3 purinoceptor and IB4 binding sites. *Eur J Neurosci*, **11**, 946-958.
- Guo, J., Wu, Y., Zhang, W., Zhao, J., Devi, L.A., Pei, G. et Ma, L. (2000) Identification of G protein-coupled receptor kinase 2 phosphorylation sites responsible for agonist-stimulated delta-opioid receptor phosphorylation. *Mol Pharmacol*, **58**, 1050-1056.
- Gupta, A., Mulder, J., Gomes, I., Rozenfeld, R., Bushlin, I., Ong, E., Lim, M., Maillet, E., Junek, M., Cahill, C.M., Harkany, T. et Devi, L.A. (2010) Increased abundance of opioid receptor heteromers after chronic morphine administration. *Sci Signal*, **3**, ra54.
- Hack, S.P., Bagley, E.E., Chieng, B.C. et Christie, M.J. (2005) Induction of delta-opioid receptor function in the midbrain after chronic morphine treatment. *J Neurosci*, **25**, 3192-3198.
- Hall, R.A., Premont, R.T., Chow, C.W., Blitzer, J.T., Pitcher, J.A., Claing, A., Stoffel, R.H., Barak, L.S., Shenolikar, S., Weinman, E.J., Grinstein, S. et Lefkowitz, R.J. (1998) The beta2-adrenergic receptor interacts with the Na⁺/H⁺-exchanger regulatory factor to control Na⁺/H⁺ exchange. *Nature*, **392**, 626-630.
- Hanyaloglu, A.C. et von Zastrow, M. (2008) Regulation of GPCRs by endocytic membrane trafficking and its potential implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **48**, 537-568.
- Hao, J.X., Yu, W., Wiesenfeld-Hallin, Z. et Xu, X.J. (1998a) Treatment of chronic allodynia in spinally injured rats: effects of intrathecal selective opioid receptor agonists. *Pain*, **75**, 209-217.
- Hao, J.X., Yu, W. et Xu, X.J. (1998b) Evidence that spinal endogenous opioidergic systems control the expression of chronic pain-related behaviors in spinally injured rats. *Exp Brain Res*, **118**, 259-268.

- Hasbi, A., Nguyen, T., Fan, T., Cheng, R., Rashid, A., Alijaniam, M., Rasenick, M.M., O'Dowd, B.F. et George, S.R. (2007) Trafficking of preassembled opioid mu-delta heterooligomer-Gz signaling complexes to the plasma membrane: coregulation by agonists. *Biochemistry*, **46**, 12997-13009.
- Heiss, A., Ammer, H. et Eisinger, D.A. (2009) delta-Opioid receptor-stimulated Akt signaling in neuroblastoma x glioma (NG108-15) hybrid cells involves receptor tyrosine kinase-mediated PI3K activation. *Exp Cell Res*, **315**, 2115-2125.
- Helke, C.J., Krause, J.E., Mantyh, P.W., Couture, R. et Bannon, M.J. (1990) Diversity in mammalian tachykinin peptidergic neurons: multiple peptides, receptors, and regulatory mechanisms. *Faseb J*, **4**, 1606-1615.
- Hervera, A., Leanez, S., Negrete, R. et Pol, O. (2009) The peripheral administration of a nitric oxide donor potentiates the local antinociceptive effects of a DOR agonist during chronic inflammatory pain in mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, **380**, 345-352.
- Hervera, A., Negrete, R., Leanez, S., Martin-Campos, J. et Pol, O. (2010) The role of nitric oxide in the local antiallodynic and antihyperalgesic effects and expression of delta-opioid and cannabinoid-2 receptors during neuropathic pain in mice. *J Pharmacol Exp Ther*, **334**, 887-896.
- Heydorn, A., Sondergaard, B.P., Ersboll, B., Holst, B., Nielsen, F.C., Haft, C.R., Whistler, J. et Schwartz, T.W. (2004) A library of 7TM receptor C-terminal tails. Interactions with the proposed post-endocytic sorting proteins ERM-binding phosphoprotein 50 (EBP50), N-ethylmaleimide-sensitive factor (NSF), sorting nexin 1 (SNX1), and G protein-coupled receptor-associated sorting protein (GASP). *J Biol Chem*, **279**, 54291-54303.
- Hokfelt, T., Kellerth, J.O., Nilsson, G. et Pernow, B. (1975a) Experimental immunohistochemical studies on the localization and distribution of substance P in cat primary sensory neurons. *Brain Res*, **100**, 235-252.
- Hokfelt, T., Kellerth, J.O., Nilsson, G. et Pernow, B. (1975b) Substance p: localization in the central nervous system and in some primary sensory neurons. *Science*, **190**, 889-890.
- Holdridge, S.V. et Cahill, C.M. (2007) Spinal administration of a delta opioid receptor agonist attenuates hyperalgesia and allodynia in a rat model of neuropathic pain. *Eur J Pain*, **11**, 685-693.
- Holmdahl, R., Lorentzen, J.C., Lu, S., Olofsson, P., Wester, L., Holmberg, J. et Pettersson, U. (2001) Arthritis induced in rats with nonimmunogenic adjuvants as models for rheumatoid arthritis. *Immunol Rev*, **184**, 184-202.

- Holzer, A.M. et Granstein, R.D. (2004) Role of extracellular adenosine triphosphate in human skin. *J Cutan Med Surg*, **8**, 90-96.
- Honor, P., Menning, P.M., Rogers, S.D., Nichols, M.L., Basbaum, A.I., Besson, J.M. et Mantyh, P.W. (1999) Spinal substance P receptor expression and internalization in acute, short-term, and long-term inflammatory pain states. *J Neurosci*, **19**, 7670-7678.
- Hoogerwerf, W.A., Zou, L., Shenoy, M., Sun, D., Micci, M.A., Lee-Hellmich, H., Xiao, S.Y., Winston, J.H. et Pasricha, P.J. (2001) The proteinase-activated receptor 2 is involved in nociception. *J Neurosci*, **21**, 9036-9042.
- Huang, L.Y. et Neher, E. (1996) Ca(2+)-dependent exocytosis in the somata of dorsal root ganglion neurons. *Neuron*, **17**, 135-145.
- Huang, P., Steplock, D., Weinman, E.J., Hall, R.A., Ding, Z., Li, J., Wang, Y. et Liu-Chen, L.Y. (2004) kappa Opioid receptor interacts with Na(+)/H(+)-exchanger regulatory factor-1/Ezrin-radixin-moesin-binding phosphoprotein-50 (NHERF-1/EBP50) to stimulate Na(+)/H(+) exchange independent of G(i)/G(o) proteins. *J Biol Chem*, **279**, 25002-25009.
- Hunt, S.P. et Mantyh, P.W. (2001) The molecular dynamics of pain control. *Nat Rev Neurosci*, **2**, 83-91.
- Hurley, R.W. et Hammond, D.L. (2000) The analgesic effects of supraspinal mu and delta opioid receptor agonists are potentiated during persistent inflammation. *J Neurosci*, **20**, 1249-1259.
- Hutcheson, D.M., Matthes, H.W., Valjent, E., Sanchez-Blazquez, P., Rodriguez-Diaz, M., Garzon, J., Kieffer, B.L. et Maldonado, R. (2001) Lack of dependence and rewarding effects of deltorphin II in mu-opioid receptor-deficient mice. *Eur J Neurosci*, **13**, 153-161.
- Hylden, J.L., Noguchi, K. et Ruda, M.A. (1992) Neonatal capsaicin treatment attenuates spinal Fos activation and dynorphin gene expression following peripheral tissue inflammation and hyperalgesia. *J Neurosci*, **12**, 1716-1725.
- Hylden, J.L., Thomas, D.A., Iadarola, M.J., Nahin, R.L. et Dubner, R. (1991) Spinal opioid analgesic effects are enhanced in a model of unilateral inflammation/hyperalgesia: possible involvement of noradrenergic mechanisms. *Eur J Pharmacol*, **194**, 135-143.
- Ingram, S.L. et Williams, J.T. (1994) Opioid inhibition of I_h via adenylyl cyclase. *Neuron*, **13**, 179-186.

- Izenwasser, S., Buzas, B. et Cox, B.M. (1993) Differential regulation of adenylyl cyclase activity by mu and delta opioids in rat caudate putamen and nucleus accumbens. *J Pharmacol Exp Ther*, **267**, 145-152.
- Janecka, A., Fichna, J. et Janecki, T. (2004) Opioid receptors and their ligands. *Curr Top Med Chem*, **4**, 1-17.
- Ji, R.R., Zhang, Q., Law, P.Y., Low, H.H., Elde, R. et Hokfelt, T. (1995) Expression of mu-, delta-, and kappa-opioid receptor-like immunoreactivities in rat dorsal root ganglia after carrageenan-induced inflammation. *J Neurosci*, **15**, 8156-8166.
- Jiang, Q., Sheldon, R.J. et Porreca, F. (1990) Opioid modulation of basal intestinal fluid transport in the mouse: actions at central, but not intestinal, sites. *J Pharmacol Exp Ther*, **253**, 784-790.
- Jordan, B.A. et Devi, L.A. (1999) G-protein-coupled receptor heterodimerization modulates receptor function. *Nature*, **399**, 697-700.
- Jordan, B.A., Trapaidze, N., Gomes, I., Nivarthi, R. et Devi, L.A. (2001) Oligomerization of opioid receptors with beta 2-adrenergic receptors: a role in trafficking and mitogen-activated protein kinase activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 343-348.
- Joseph, E.K. et Levine, J.D. (2010) Mu and delta opioid receptors on nociceptors attenuate mechanical hyperalgesia in rat. *Neuroscience*.
- Julius, D. et Basbaum, A.I. (2001) Molecular mechanisms of nociception. *Nature*, **413**, 203-210.
- Julius, D. et Basbaum, A.I. (2005) A neuropeptide courier for delta-opioid receptors? *Cell*, **122**, 496-498.
- Kabli, N. et Cahill, C.M. (2007) Anti-allodynic effects of peripheral delta opioid receptors in neuropathic pain. *Pain*, **127**, 84-93.
- Kabli, N., Martin, N., Fan, T., Nguyen, T., Hasbi, A., Balboni, G., O'Dowd, B. et George, S. (2010) Agonists at the delta-opioid receptor modify the binding of micro-receptor agonists to the micro-delta receptor hetero-oligomer. *Br J Pharmacol*, **161**, 1122-1136.
- Kallal, L. et Benovic, J.L. (2000) Using green fluorescent proteins to study G-protein-coupled receptor localization and trafficking. *Trends Pharmacol Sci*, **21**, 175-180.
- Kane, B.E., Svensson, B. et Ferguson, D.M. (2006) Molecular recognition of opioid receptor ligands. *AAPS J*, **8**, E126-137.

- Kawaguchi, Y., Hoshimaru, M., Nawa, H. et Nakanishi, S. (1986) Sequence analysis of cloned cDNA for rat substance P precursor: existence of a third substance P precursor. *Biochem Biophys Res Commun*, **139**, 1040-1046.
- Khotib, J., Narita, M., Suzuki, M., Yajima, Y. et Suzuki, T. (2004) Functional interaction among opioid receptor types: up-regulation of mu- and delta-opioid receptor functions after repeated stimulation of kappa-opioid receptors. *Neuropharmacology*, **46**, 531-540.
- Kieffer, B.L. (1999) Opioids: first lessons from knockout mice. *Trends Pharmacol Sci*, **20**, 19-26.
- Kieffer, B.L., Befort, K., Gaveriaux-Ruff, C. et Hirth, C.G. (1992) The delta-opioid receptor: isolation of a cDNA by expression cloning and pharmacological characterization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 12048-12052.
- Kim, K.A. et von Zastrow, M. (2003) Neurotrophin-regulated sorting of opioid receptors in the biosynthetic pathway of neurosecretory cells. *J Neurosci*, **23**, 2075-2085.
- King, T., Gardell, L.R., Wang, R., Vardanyan, A., Ossipov, M.H., Malan, T.P., Jr., Vanderah, T.W., Hunt, S.P., Hruby, V.J., Lai, J. et Porreca, F. (2005) Role of NK-1 neurotransmission in opioid-induced hyperalgesia. *Pain*, **116**, 276-288.
- Knapp, R.J., Landsman, R., Waite, S., Malatynska, E., Varga, E., Haq, W., Hruby, V.J., Roeske, W.R., Nagase, H. et Yamamura, H.I. (1995) Properties of TAN-67, a nonpeptidic delta-opioid receptor agonist, at cloned human delta- and mu-opioid receptors. *Eur J Pharmacol*, **291**, 129-134.
- Kondo, I., Marvizon, J.C., Song, B., Salgado, F., Codeluppi, S., Hua, X.Y. et Yaksh, T.L. (2005) Inhibition by spinal mu- and delta-opioid agonists of afferent-evoked substance P release. *J Neurosci*, **25**, 3651-3660.
- Kotani, H., Hoshimaru, M., Nawa, H. et Nakanishi, S. (1986) Structure and gene organization of bovine neuromedin K precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **83**, 7074-7078.
- Kovoor, A., Nappey, V., Kieffer, B.L. et Chavkin, C. (1997) Mu and delta opioid receptors are differentially desensitized by the coexpression of beta-adrenergic receptor kinase 2 and beta-arrestin 2 in xenopus oocytes. *J Biol Chem*, **272**, 27605-27611.
- Krames, E.S., Wilkie, D.J. et Gershow, J. (1986) Intrathecal D-Ala2-D-Leu5-enkephalin (DADL) restores analgesia in a patient analgetically tolerant to intrathecal morphine sulfate. *Pain*, **24**, 205-209.

- Krause, J.E., Chirgwin, J.M., Carter, M.S., Xu, Z.S. et Hershey, A.D. (1987) Three rat preprotachykinin mRNAs encode the neuropeptides substance P and neurokinin A. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**, 881-885.
- Kreek, M.J. (1996) Opioid receptors: some perspectives from early studies of their role in normal physiology, stress responsivity, and in specific addictive diseases. *Neurochem Res*, **21**, 1469-1488.
- Laneuville, O., Dorais, J. et Couture, R. (1988) Characterization of the effects produced by neurokinins and three agonists selective for neurokinin receptor subtypes in a spinal nociceptive reflex of the rat. *Life Sci*, **42**, 1295-1305.
- Lariviere, W.R., Chesler, E.J. et Mogil, J.S. (2001) Transgenic studies of pain and analgesia: mutation or background genotype? *J Pharmacol Exp Ther*, **297**, 467-473.
- Law, P.Y., Erickson-Herbrandson, L.J., Zha, Q.Q., Solberg, J., Chu, J., Sarre, A. et Loh, H.H. (2005) Heterodimerization of mu- and delta-opioid receptors occurs at the cell surface only and requires receptor-G protein interactions. *J Biol Chem*, **280**, 11152-11164.
- Leanez, S., Hervera, A. et Pol, O. (2009) Peripheral antinociceptive effects of mu- and delta-opioid receptor agonists in NOS2 and NOS1 knockout mice during chronic inflammatory pain. *Eur J Pharmacol*, **602**, 41-49.
- Lee, M.C., Cahill, C.M., Vincent, J.P. et Beaudet, A. (2002) Internalization and trafficking of opioid receptor ligands in rat cortical neurons. *Synapse*, **43**, 102-111.
- Leskela, T.T., Markkanen, P.M., Pietila, E.M., Tuusa, J.T. et Petaja-Repo, U.E. (2007) Opioid receptor pharmacological chaperones act by binding and stabilizing newly synthesized receptors in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, **282**, 23171-23183.
- Li, J., Xiang, B., Su, W., Zhang, X., Huang, Y. et Ma, L. (2003) Agonist-induced formation of opioid receptor-G protein-coupled receptor kinase (GRK)-G beta gamma complex on membrane is required for GRK2 function in vivo. *J Biol Chem*, **278**, 30219-30226.
- Li, J.G., Chen, C. et Liu-Chen, L.Y. (2002) Ezrin-radixin-moesin-binding phosphoprotein-50/Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor (EBP50/NHERF) blocks U50,488H-induced down-regulation of the human kappa opioid receptor by enhancing its recycling rate. *J Biol Chem*, **277**, 27545-27552.

- Lowe, J.D., Celver, J.P., Gurevich, V.V. et Chavkin, C. (2002) mu-Opioid receptors desensitize less rapidly than delta-opioid receptors due to less efficient activation of arrestin. *J Biol Chem*, **277**, 15729-15735.
- Lucido, A.L., Morinville, A., Gendron, L., Stroh, T. et Beaudet, A. (2005) Prolonged morphine treatment selectively increases membrane recruitment of delta-opioid receptors in mouse basal ganglia. *J Mol Neurosci*, **25**, 207-214.
- Ma, G.Q., Wang, B., Wang, H.B., Wang, Q. et Bao, L. (2008) Short elements with charged amino acids form clusters to sort protachykinin into large dense-core vesicles. *Traffic*, **9**, 2165-2179.
- Ma, J., Zhang, Y., Kalyuzhny, A.E. et Pan, Z.Z. (2006) Emergence of functional delta-opioid receptors induced by long-term treatment with morphine. *Mol Pharmacol*, **69**, 1137-1145.
- Madziva, M.T. et Edwardson, J.M. (2001) Trafficking of green fluorescent protein-tagged muscarinic M4 receptors in NG108-15 cells. *Eur J Pharmacol*, **428**, 9-18.
- Maekawa, K., Minami, M., Yabuuchi, K., Toya, T., Katao, Y., Hosoi, Y., Onogi, T. et Satoh, M. (1994) In situ hybridization study of mu- and kappa-opioid receptor mRNAs in the rat spinal cord and dorsal root ganglia. *Neurosci Lett*, **168**, 97-100.
- Malmberg, A.B. et Yaksh, T.L. (1992) Isobolographic and dose-response analyses of the interaction between intrathecal mu and delta agonists: effects of naltrindole and its benzofuran analog (NTB). *J Pharmacol Exp Ther*, **263**, 264-275.
- Mansour, A., Fox, C.A., Akil, H. et Watson, S.J. (1995) Opioid-receptor mRNA expression in the rat CNS: anatomical and functional implications. *Trends Neurosci*, **18**, 22-29.
- Mansour, A., Fox, C.A., Burke, S., Meng, F., Thompson, R.C., Akil, H. et Watson, S.J. (1994) Mu, delta, and kappa opioid receptor mRNA expression in the rat CNS: an in situ hybridization study. *J Comp Neurol*, **350**, 412-438.
- Mantyh, P.W., Rogers, S.D., Honore, P., Allen, B.J., Ghilardi, J.R., Li, J., Daughters, R.S., Lappi, D.A., Wiley, R.G. et Simone, D.A. (1997) Inhibition of hyperalgesia by ablation of lamina I spinal neurons expressing the substance P receptor. *Science*, **278**, 275-279.
- Marker, C.L., Lujan, R., Loh, H.H. et Wickman, K. (2005) Spinal G-protein-gated potassium channels contribute in a dose-dependent manner to the analgesic effect of mu- and delta- but not kappa-opioids. *J Neurosci*, **25**, 3551-3559.

- Markkanen, P.M. et Petaja-Repo, U.E. (2008) N-glycan-mediated quality control in the endoplasmic reticulum is required for the expression of correctly folded delta-opioid receptors at the cell surface. *J Biol Chem*, **283**, 29086-29098.
- Marley, A. et von Zastrow, M. (2010) Dysbindin promotes the post-endocytic sorting of G protein-coupled receptors to lysosomes. *PLoS One*, **5**, e9325.
- Martin, N.A. et Prather, P.L. (2001) Interaction of co-expressed mu- and delta-opioid receptors in transfected rat pituitary GH(3) cells. *Mol Pharmacol*, **59**, 774-783.
- Mattia, A., Farmer, S.C., Takemori, A.E., Sultana, M., Portoghese, P.S., Mosberg, H.I., Bowen, W.D. et Porreca, F. (1992) Spinal opioid delta antinociception in the mouse: mediation by a 5'-NTII-sensitive delta receptor subtype. *J Pharmacol Exp Ther*, **260**, 518-525.
- Mattia, A., Vanderah, T., Mosberg, H.I. et Porreca, F. (1991) Lack of antinociceptive cross-tolerance between [D-Pen2, D-Pen5]enkephalin and [D-Ala2]deltorphin II in mice: evidence for delta receptor subtypes. *J Pharmacol Exp Ther*, **258**, 583-587.
- Mauborgne, A., Lutz, O., Legrand, J.C., Hamon, M. et Cesselin, F. (1987) Opposite effects of delta and mu opioid receptor agonists on the in vitro release of substance P-like material from the rat spinal cord. *J Neurochem*, **48**, 529-537.
- May, C.N., Dashwood, M.R., Whitehead, C.J. et Mathias, C.J. (1989) Differential cardiovascular and respiratory responses to central administration of selective opioid agonists in conscious rabbits: correlation with receptor distribution. *Br J Pharmacol*, **98**, 903-913.
- Mazario, J. et Basbaum, A.I. (2007) Contribution of substance P and neurokinin A to the differential injury-induced thermal and mechanical responsiveness of lamina I and V neurons. *J Neurosci*, **27**, 762-770.
- McCarthy, P.W. et Lawson, S.N. (1989) Cell type and conduction velocity of rat primary sensory neurons with substance P-like immunoreactivity. *Neuroscience*, **28**, 745-753.
- McDonald, N.A., Henstridge, C.M., Connolly, C.N. et Irving, A.J. (2007) Generation and functional characterization of fluorescent, N-terminally tagged CB1 receptor chimeras for live-cell imaging. *Mol Cell Neurosci*, **35**, 237-248.
- McLean, A.J. et Milligan, G. (2000) Ligand regulation of green fluorescent protein-tagged forms of the human beta(1)- and beta(2)-adrenoceptors; comparisons with the unmodified receptors. *Br J Pharmacol*, **130**, 1825-1832.

- McMahon, S.B. (1996) NGF as a mediator of inflammatory pain. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **351**, 431-440.
- McQuay, H. (1999) Opioids in pain management. *Lancet*, **353**, 2229-2232.
- McVey, M., Ramsay, D., Kellett, E., Rees, S., Wilson, S., Pope, A.J. et Milligan, G. (2001) Monitoring receptor oligomerization using time-resolved fluorescence resonance energy transfer and bioluminescence resonance energy transfer. The human delta -opioid receptor displays constitutive oligomerization at the cell surface, which is not regulated by receptor occupancy. *J Biol Chem*, **276**, 14092-14099.
- Meng, F., Xie, G.X., Thompson, R.C., Mansour, A., Goldstein, A., Watson, S.J. et Akil, H. (1993) Cloning and pharmacological characterization of a rat kappa opioid receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 9954-9958.
- Mennicken, F., Zhang, J., Hoffert, C., Ahmad, S., Beaudet, A. et O'Donnell, D. (2003) Phylogenetic changes in the expression of delta opioid receptors in spinal cord and dorsal root ganglia. *J Comp Neurol*, **465**, 349-360.
- Merighi, A., Polak, J.M., Gibson, S.J., Gulbenkian, S., Valentino, K.L. et Peirone, S.M. (1988) Ultrastructural studies on calcitonin gene-related peptide-, tachykinins- and somatostatin-immunoreactive neurones in rat dorsal root ganglia: evidence for the colocalization of different peptides in single secretory granules. *Cell Tissue Res*, **254**, 101-109.
- Michael, G.J. et Priestley, J.V. (1999) Differential expression of the mRNA for the vanilloid receptor subtype 1 in cells of the adult rat dorsal root and nodose ganglia and its downregulation by axotomy. *J Neurosci*, **19**, 1844-1854.
- Mika, J., Przewlocki, R. et Przewlocka, B. (2001) The role of delta-opioid receptor subtypes in neuropathic pain. *Eur J Pharmacol*, **415**, 31-37.
- Minami, M., Maekawa, K., Yabuuchi, K. et Satoh, M. (1995) Double in situ hybridization study on coexistence of mu-, delta- and kappa-opioid receptor mRNAs with preprotachykinin A mRNA in the rat dorsal root ganglia. *Brain Res Mol Brain Res*, **30**, 203-210.
- Mizoguchi, H., Narita, M., Nagase, H. et Tseng, L.F. (1995) Antisense oligodeoxynucleotide to a delta-opioid receptor blocks the antinociception induced by cold water swimming. *Regul Pept*, **59**, 255-259.
- Mogil, J.S., Wilson, S.G., Bon, K., Lee, S.E., Chung, K., Raber, P., Pieper, J.O., Hain, H.S., Belknap, J.K., Hubert, L., Elmer, G.I., Chung, J.M. et Devor, M. (1999) Heritability of nociception I: responses of 11 inbred mouse strains on 12 measures of nociception. *Pain*, **80**, 67-82.

- Morinville, A., Cahill, C.M., Aibak, H., Rymar, V.V., Pradhan, A., Hoffert, C., Mennicken, F., Stroh, T., Sadikot, A.F., O'Donnell, D., Clarke, P.B., Collier, B., Henry, J.L., Vincent, J.P. et Beaudet, A. (2004a) Morphine-induced changes in delta opioid receptor trafficking are linked to somatosensory processing in the rat spinal cord. *J Neurosci*, **24**, 5549-5559.
- Morinville, A., Cahill, C.M., Esdaile, M.J., Aibak, H., Collier, B., Kieffer, B.L. et Beaudet, A. (2003) Regulation of delta-opioid receptor trafficking via mu-opioid receptor stimulation: evidence from mu-opioid receptor knock-out mice. *J Neurosci*, **23**, 4888-4898.
- Morinville, A., Cahill, C.M., Kieffer, B., Collier, B. et Beaudet, A. (2004b) Mu-opioid receptor knockout prevents changes in delta-opioid receptor trafficking induced by chronic inflammatory pain. *Pain*, **109**, 266-273.
- Morris, B.J., Millan, M.J. et Herz, A. (1988) Antagonist-induced opioid receptor up-regulation. II. Regionally specific modulation of mu, delta and kappa binding sites in rat brain revealed by quantitative autoradiography. *J Pharmacol Exp Ther*, **247**, 729-736.
- Moulin, D.E., Max, M.B., Kaiko, R.F., Inturrisi, C.E., Maggard, J., Yaksh, T.L. et Foley, K.M. (1985) The analgesic efficacy of intrathecal D-Ala2-D-Leu5-enkephalin in cancer patients with chronic pain. *Pain*, **23**, 213-221.
- Nadal, X., Banos, J.E., Kieffer, B.L. et Maldonado, R. (2006) Neuropathic pain is enhanced in delta-opioid receptor knockout mice. *Eur J Neurosci*, **23**, 830-834.
- Nakatsuka, T., Mena, N., Ling, J. et Gu, J.G. (2001) Depletion of substance P from rat primary sensory neurons by ATP, an implication of P2X receptor-mediated release of substance P. *Neuroscience*, **107**, 293-300.
- Nawa, H., Hirose, T., Takashima, H., Inayama, S. et Nakanishi, S. (1983) Nucleotide sequences of cloned cDNAs for two types of bovine brain substance P precursor. *Nature*, **306**, 32-36.
- Nawa, H., Kotani, H. et Nakanishi, S. (1984) Tissue-specific generation of two preprotachykinin mRNAs from one gene by alternative RNA splicing. *Nature*, **312**, 729-734.
- Nichols, M.L., Bian, D., Ossipov, M.H., Lai, J. et Porreca, F. (1995) Regulation of morphine antiallodynic efficacy by cholecystokinin in a model of neuropathic pain in rats. *J Pharmacol Exp Ther*, **275**, 1339-1345.
- Okiyoneda, T., Niibori, A., Harada, K., Kohno, T., Michalak, M., Duszyk, M., Wada, I., Ikawa, M., Shuto, T., Suico, M.A. et Kai, H. (2008) Role of calnexin in the ER

- quality control and productive folding of CFTR; differential effect of calnexin knockout on wild-type and DeltaF508 CFTR. *Biochim Biophys Acta*, **1783**, 1585-1594.
- Onofrio, B.M. et Yaksh, T.L. (1983) Intrathecal delta-receptor ligand produces analgesia in man. *Lancet*, **1**, 1386-1387.
- Otsuka, M. et Yoshioka, K. (1993) Neurotransmitter functions of mammalian tachykinins. *Physiol Rev*, **73**, 229-308.
- Pasquini, F., Bochet, P., Garbay-Jaureguiberry, C., Roques, B.P., Rossier, J. et Beaudet, A. (1992) Electron microscopic localization of photoaffinity-labelled delta opioid receptors in the neostriatum of the rat. *J Comp Neurol*, **326**, 229-244.
- Patwardhan, A.M., Berg, K.A., Akopian, A.N., Jeske, N.A., Gamper, N., Clarke, W.P. et Hargreaves, K.M. (2005) Bradykinin-induced functional competence and trafficking of the delta-opioid receptor in trigeminal nociceptors. *J Neurosci*, **25**, 8825-8832.
- Patwardhan, A.M., Diogenes, A., Berg, K.A., Fehrenbacher, J.C., Clarke, W.P., Akopian, A.N. et Hargreaves, K.M. (2006) PAR-2 agonists activate trigeminal nociceptors and induce functional competence in the delta opioid receptor. *Pain*, **125**, 114-124.
- Pello, O.M., Martinez-Munoz, L., Parrillas, V., Serrano, A., Rodriguez-Frade, J.M., Toro, M.J., Lucas, P., Monterrubio, M., Martinez, A.C. et Mellado, M. (2008) Ligand stabilization of CXCR4/delta-opioid receptor heterodimers reveals a mechanism for immune response regulation. *Eur J Immunol*, **38**, 537-549.
- Perron, A., Sharif, N., Gendron, L., Lavalley, M., Stroh, T., Mazella, J. et Beaudet, A. (2006) Sustained neurotensin exposure promotes cell surface recruitment of NTS2 receptors. *Biochem Biophys Res Commun*, **343**, 799-808.
- Petaja-Repo, U.E., Hogue, M., Bhalla, S., Laperriere, A., Morello, J.P. et Bouvier, M. (2002) Ligands act as pharmacological chaperones and increase the efficiency of delta opioid receptor maturation. *Embo J*, **21**, 1628-1637.
- Petaja-Repo, U.E., Hogue, M., Laperriere, A., Bhalla, S., Walker, P. et Bouvier, M. (2001) Newly synthesized human delta opioid receptors retained in the endoplasmic reticulum are retrotranslocated to the cytosol, deglycosylated, ubiquitinated, and degraded by the proteasome. *J Biol Chem*, **276**, 4416-4423.
- Petaja-Repo, U.E., Hogue, M., Laperriere, A., Walker, P. et Bouvier, M. (2000) Export from the endoplasmic reticulum represents the limiting step in the maturation and cell surface expression of the human delta opioid receptor. *J Biol Chem*, **275**, 13727-13736.

- Petaja-Repo, U.E., Hogue, M., Leskela, T.T., Markkanen, P.M., Tuusa, J.T. et Bouvier, M. (2006) Distinct subcellular localization for constitutive and agonist-modulated palmitoylation of the human delta opioid receptor. *J Biol Chem*, **281**, 15780-15789.
- Petrillo, P., Angelici, O., Bingham, S., Ficalora, G., Garnier, M., Zaratini, P.F., Petrone, G., Pozzi, O., Sbacchi, M., Stean, T.O., Upton, N., Dondio, G.M. et Scheideler, M.A. (2003) Evidence for a selective role of the delta-opioid agonist [8R-(4bS*,8aalpha,8abeta,12bbeta)]7,10-Dimethyl-1-methoxy-11-(2-methylpropyl)oxycarbonyl 5,6,7,8,12,12b-hexahydro-(9H)-4,8-methanobenzofuro[3,2-e]pyrrolo[2,3-g]iso quinoline hydrochloride (SB-235863) in blocking hyperalgesia associated with inflammatory and neuropathic pain responses. *J Pharmacol Exp Ther*, **307**, 1079-1089.
- Pfeiffer, A., Brantl, V., Herz, A. et Emrich, H.M. (1986) Psychotomimesis mediated by kappa opiate receptors. *Science*, **233**, 774-776.
- Pickel, V.M., Reis, D.J. et Leeman, S.E. (1977) Ultrastructural localization of substance P in neurons of rat spinal cord. *Brain Res*, **122**, 534-540.
- Porreca, F., Mosberg, H.I., Hurst, R., Hruby, V.J. et Burks, T.F. (1984) Roles of mu, delta and kappa opioid receptors in spinal and supraspinal mediation of gastrointestinal transit effects and hot-plate analgesia in the mouse. *J Pharmacol Exp Ther*, **230**, 341-348.
- Portoghese, P.S., el Kouhen, R., Law, P.Y., Loh, H.H. et Le Bourdonnec, B. (2001) Affinity labels as tools for the identification of opioid receptor recognition sites. *Farmaco*, **56**, 191-196.
- Potrebic, S., Ahn, A.H., Skinner, K., Fields, H.L. et Basbaum, A.I. (2003) Peptidergic nociceptors of both trigeminal and dorsal root ganglia express serotonin 1D receptors: implications for the selective antimigraine action of triptans. *J Neurosci*, **23**, 10988-10997.
- Pradhan, A.A. et Clarke, P.B. (2005) Comparison between delta-opioid receptor functional response and autoradiographic labeling in rat brain and spinal cord. *J Comp Neurol*, **481**, 416-426.
- Pradhan, A.A., Siau, C., Constantin, A. et Clarke, P.B. (2006) Chronic morphine administration results in tolerance to delta opioid receptor-mediated antinociception. *Neuroscience*, **141**, 947-954.
- Qiu, C., Sora, I., Ren, K., Uhl, G. et Dubner, R. (2000) Enhanced delta-opioid receptor-mediated antinociception in mu-opioid receptor-deficient mice. *Eur J Pharmacol*, **387**, 163-169.

- Quock, R.M., Burkey, T.H., Varga, E., Hosohata, Y., Hosohata, K., Cowell, S.M., Slate, C.A., Ehler, F.J., Roeske, W.R. et Yamamura, H.I. (1999) The delta-opioid receptor: molecular pharmacology, signal transduction, and the determination of drug efficacy. *Pharmacol Rev*, **51**, 503-532.
- Riedl, M.S., Schnell, S.A., Overland, A.C., Chabot-Dore, A.J., Taylor, A.M., Ribeiro-da-Silva, A., Elde, R.P., Wilcox, G.L. et Stone, L.S. (2009) Coexpression of alpha 2A-adrenergic and delta-opioid receptors in substance P-containing terminals in rat dorsal horn. *J Comp Neurol*, **513**, 385-398.
- Rothman, J.E. et Orci, L. (1992) Molecular dissection of the secretory pathway. *Nature*, **355**, 409-415.
- Rowan, M.P., Ruparel, N.B., Patwardhan, A.M., Berg, K.A., Clarke, W.P. et Hargreaves, K.M. (2009) Peripheral delta opioid receptors require priming for functional competence in vivo. *Eur J Pharmacol*, **602**, 283-287.
- Rozenfeld, R. et Devi, L.A. (2007) Receptor heterodimerization leads to a switch in signaling: beta-arrestin2-mediated ERK activation by mu-delta opioid receptor heterodimers. *Faseb J*, **21**, 2455-2465.
- Rozenfeld, R. et Devi, L.A. (2010) Receptor heteromerization and drug discovery. *Trends Pharmacol Sci*, **31**, 124-130.
- Ruscheweyh, R., Forsthuber, L., Schoffnegger, D. et Sandkuhler, J. (2007) Modification of classical neurochemical markers in identified primary afferent neurons with Abeta-, Adelta-, and C-fibers after chronic constriction injury in mice. *J Comp Neurol*, **502**, 325-336.
- Saito, H., Kubota, M., Roberts, R.W., Chi, Q. et Matsunami, H. (2004) RTP family members induce functional expression of mammalian odorant receptors. *Cell*, **119**, 679-691.
- Salio, C., Averill, S., Priestley, J.V. et Merighi, A. (2007) Costorage of BDNF and neuropeptides within individual dense-core vesicles in central and peripheral neurons. *Dev Neurobiol*, **67**, 326-338.
- Schepers, R.J., Mahoney, J.L., Gehrke, B.J. et Shippenberg, T.S. (2008) Endogenous kappa-opioid receptor systems inhibit hyperalgesia associated with localized peripheral inflammation. *Pain*, **138**, 423-439.
- Scherrer, G., Befort, K., Contet, C., Becker, J., Matifas, A. et Kieffer, B.L. (2004) The delta agonists DPDPE and deltorphin II recruit predominantly mu receptors to produce thermal analgesia: a parallel study of mu, delta and combinatorial opioid receptor knockout mice. *Eur J Neurosci*, **19**, 2239-2248.

- Scherrer, G., Imamachi, N., Cao, Y.Q., Contet, C., Mennicken, F., O'Donnell, D., Kieffer, B.L. et Basbaum, A.I. (2009) Dissociation of the opioid receptor mechanisms that control mechanical and heat pain. *Cell*, **137**, 1148-1159.
- Scherrer, G., Tryoen-Toth, P., Filliol, D., Matifas, A., Laustriat, D., Cao, Y.Q., Basbaum, A.I., Dierich, A., Vonesh, J.L., Gaveriaux-Ruff, C. et Kieffer, B.L. (2006) Knockin mice expressing fluorescent delta-opioid receptors uncover G protein-coupled receptor dynamics in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 9691-9696.
- Schramm, C.L. et Honda, C.N. (2010) Co-administration of delta- and mu-opioid receptor agonists promotes peripheral opioid receptor function. *Pain*, **151**, 763-770.
- Schulz, R., Wehmeyer, A. et Schulz, K. (2002) Opioid receptor types selectively cointernalize with G protein-coupled receptor kinases 2 and 3. *J Pharmacol Exp Ther*, **300**, 376-384.
- Seward, E.P., Chernevskaya, N.I. et Nowycky, M.C. (1995) Exocytosis in peptidergic nerve terminals exhibits two calcium-sensitive phases during pulsatile calcium entry. *J Neurosci*, **15**, 3390-3399.
- Shenolikar, S., Voltz, J.W., Minkoff, C.M., Wade, J.B. et Weinman, E.J. (2002) Targeted disruption of the mouse NHERF-1 gene promotes internalization of proximal tubule sodium-phosphate cotransporter type IIa and renal phosphate wasting. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 11470-11475.
- Simonin, F., Karcher, P., Boeuf, J.J., Matifas, A. et Kieffer, B.L. (2004) Identification of a novel family of G protein-coupled receptor associated sorting proteins. *J Neurochem*, **89**, 766-775.
- Sofroniew, M.V., Howe, C.L. et Mobley, W.C. (2001) Nerve growth factor signaling, neuroprotection, and neural repair. *Annu Rev Neurosci*, **24**, 1217-1281.
- Stein, C., Millan, M.J. et Herz, A. (1988) Unilateral inflammation of the hindpaw in rats as a model of prolonged noxious stimulation: alterations in behavior and nociceptive thresholds. *Pharmacol Biochem Behav*, **31**, 455-451.
- Steinhoff, M., Vergnolle, N., Young, S.H., Tognetto, M., Amadesi, S., Ennes, H.S., Trevisani, M., Hollenberg, M.D., Wallace, J.L., Caughey, G.H., Mitchell, S.E., Williams, L.M., Geppetti, P., Mayer, E.A. et Bunnett, N.W. (2000) Agonists of proteinase-activated receptor 2 induce inflammation by a neurogenic mechanism. *Nat Med*, **6**, 151-158.

- Stevens, C.W., Lacey, C.B., Miller, K.E., Elde, R.P. et Seybold, V.S. (1991) Biochemical characterization and regional quantification of mu, delta and kappa opioid binding sites in rat spinal cord. *Brain Res*, **550**, 77-85.
- Stewart, P.E. et Hammond, D.L. (1993) Evidence for delta opioid receptor subtypes in rat spinal cord: studies with intrathecal naltriben, cyclic[D-Pen2, D-Pen5] enkephalin and [D-Ala2, Glu4]deltorphin. *J Pharmacol Exp Ther*, **266**, 820-828.
- Stewart, P.E. et Hammond, D.L. (1994) Activation of spinal delta-1 or delta-2 opioid receptors reduces carrageenan-induced hyperalgesia in the rat. *J Pharmacol Exp Ther*, **268**, 701-708.
- Stone, L.S., Vulchanova, L., Riedl, M.S., Williams, F.G., Wilcox, G.L. et Elde, R. (2004) Effects of peripheral nerve injury on delta opioid receptor (DOR) immunoreactivity in the rat spinal cord. *Neurosci Lett*, **361**, 208-211.
- Stroh, T., Jackson, A.C., Sarret, P., Dal Farra, C., Vincent, J.P., Kreienkamp, H.J., Mazella, J. et Beaudet, A. (2000) Intracellular dynamics of sst5 receptors in transfected COS-7 cells: maintenance of cell surface receptors during ligand-induced endocytosis. *Endocrinology*, **141**, 354-365.
- Szeto, H.H., Soong, Y., Wu, D., Olariu, N., Kett, A., Kim, H. et Clapp, J.F. (1999) Respiratory depression after intravenous administration of delta-selective opioid peptide analogs. *Peptides*, **20**, 101-105.
- Takahashi, T. et Otsuka, M. (1975) Regional distribution of substance P in the spinal cord and nerve roots of the cat and the effect of dorsal root section. *Brain Res*, **87**, 1-11.
- Tanowitz, M. et Von Zastrow, M. (2002) Ubiquitination-independent trafficking of G protein-coupled receptors to lysosomes. *J Biol Chem*, **277**, 50219-50222.
- Tatemoto, K., Lundberg, J.M., Jornvall, H. et Mutt, V. (1985) Neuropeptide K: isolation, structure and biological activities of a novel brain tachykinin. *Biochem Biophys Res Commun*, **128**, 947-953.
- Terman, G.W., Shavit, Y., Lewis, J.W., Cannon, J.T. et Liebeskind, J.C. (1984) Intrinsic mechanisms of pain inhibition: activation by stress. *Science*, **226**, 1270-1277.
- Terpe, K. (2003) Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl Microbiol Biotechnol*, **60**, 523-533.
- Terrillon, S. et Bouvier, M. (2004) Roles of G-protein-coupled receptor dimerization. *EMBO Rep*, **5**, 30-34.

- Todd, A.J. (2002) Anatomy of primary afferents and projection neurones in the rat spinal dorsal horn with particular emphasis on substance P and the neurokinin 1 receptor. *Exp Physiol*, **87**, 245-249.
- Trapaidze, N., Gomes, I., Bansinath, M. et Devi, L.A. (2000) Recycling and resensitization of delta opioid receptors. *DNA Cell Biol*, **19**, 195-204.
- Trapaidze, N., Keith, D.E., Cvejic, S., Evans, C.J. et Devi, L.A. (1996) Sequestration of the delta opioid receptor. Role of the C terminus in agonist-mediated internalization. *J Biol Chem*, **271**, 29279-29285.
- Tsao, P.I. et von Zastrow, M. (2000) Type-specific sorting of G protein-coupled receptors after endocytosis. *J Biol Chem*, **275**, 11130-11140.
- Tuusa, J.T., Leskela, T.T. et Petaja-Repo, U.E. (2010) Human delta opioid receptor biogenesis is regulated via interactions with SERCA2b and calnexin. *FEBS J*.
- Tuusa, J.T., Markkanen, P.M., Apaja, P.M., Hakalahti, A.E. et Petaja-Repo, U.E. (2007) The endoplasmic reticulum Ca²⁺-pump SERCA2b interacts with G protein-coupled receptors and enhances their expression at the cell surface. *J Mol Biol*, **371**, 622-638.
- Vanderah, T.W. (2010) Delta and kappa opioid receptors as suitable drug targets for pain. *Clin J Pain*, **26 Suppl 10**, S10-15.
- Vanderah, T.W., Wild, K.D., Takemori, A.E., Sultana, M., Portoghese, P.S., Bowen, W.D., Mosberg, H.I. et Porreca, F. (1992) Mediation of swim-stress antinociception by the opioid delta 2 receptor in the mouse. *J Pharmacol Exp Ther*, **262**, 190-197.
- von Banchet, G.S. et Schaible, H.G. (1999) Localization of the neurokinin 1 receptor on a subset of substance P-positive and isolectin B4-negative dorsal root ganglion neurons of the rat. *Neurosci Lett*, **274**, 175-178.
- von Zastrow, M. (2010) Regulation of opioid receptors by endocytic membrane traffic: mechanisms and translational implications. *Drug Alcohol Depend*, **108**, 166-171.
- Vulchanova, L., Olson, T.H., Stone, L.S., Riedl, M.S., Elde, R. et Honda, C.N. (2001) Cytotoxic targeting of isolectin IB4-binding sensory neurons. *Neuroscience*, **108**, 143-155.
- Wang, D., Sun, X., Bohn, L.M. et Sadee, W. (2005) Opioid receptor homo- and heterodimerization in living cells by quantitative bioluminescence resonance energy transfer. *Mol Pharmacol*, **67**, 2173-2184.

- Wang, H. et Pickel, V.M. (2001) Preferential cytoplasmic localization of delta-opioid receptors in rat striatal patches: comparison with plasmalemmal mu-opioid receptors. *J Neurosci*, **21**, 3242-3250.
- Wang, H. et Wessendorf, M.W. (2001) Equal proportions of small and large DRG neurons express opioid receptor mRNAs. *J Comp Neurol*, **429**, 590-600.
- Wang, H.B., Guan, J.S., Bao, L. et Zhang, X. (2008) Distinct subcellular distribution of delta-opioid receptor fused with various tags in PC12 cells. *Neurochem Res*, **33**, 2028-2034.
- Wang, H.B., Zhao, B., Zhong, Y.Q., Li, K.C., Li, Z.Y., Wang, Q., Lu, Y.J., Zhang, Z.N., He, S.Q., Zheng, H.C., Wu, S.X., Hokfelt, T.G., Bao, L. et Zhang, X. (2010a) Coexpression of delta- and mu-opioid receptors in nociceptive sensory neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **107**, 13117-13122.
- Wang, Y.H., Sun, J.F., Tao, Y.M., Chi, Z.Q. et Liu, J.G. (2010b) The role of kappa-opioid receptor activation in mediating antinociception and addiction. *Acta Pharmacol Sin*, **31**, 1065-1070.
- Weinman, E.J., Hall, R.A., Friedman, P.A., Liu-Chen, L.Y. et Shenolikar, S. (2006) The association of NHERF adaptor proteins with g protein-coupled receptors and receptor tyrosine kinases. *Annu Rev Physiol*, **68**, 491-505.
- Whistler, J.L., Enquist, J., Marley, A., Fong, J., Gladher, F., Tsuruda, P., Murray, S.R. et Von Zastrow, M. (2002) Modulation of postendocytic sorting of G protein-coupled receptors. *Science*, **297**, 615-620.
- Willcockson, H.H., Chen, Y., Han, J.E. et Valtschanoff, J.G. (2010) Effect of genetic deletion of the vanilloid receptor TRPV1 on the expression of Substance P in sensory neurons of mice with adjuvant-induced arthritis. *Neuropeptides*.
- Woolf, C.J. et Salter, M.W. (2000) Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *Science*, **288**, 1765-1769.
- Yadav, P.N., Chaturvedi, K. et Howells, R.D. (2007) Inhibition of agonist-induced down-regulation of the delta-opioid receptor with a proteasome inhibitor attenuates opioid tolerance in human embryonic kidney 293 cells. *J Pharmacol Exp Ther*, **320**, 1186-1194.
- Yasuda, K., Raynor, K., Kong, H., Breder, C.D., Takeda, J., Reisine, T. et Bell, G.I. (1993) Cloning and functional comparison of kappa and delta opioid receptors from mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 6736-6740.
- Zachariou, V. et Goldstein, B.D. (1996) Delta-Opioid receptor modulation of the release of substance P-like immunoreactivity in the dorsal horn of the rat following mechanical or thermal noxious stimulation. *Brain Res*, **736**, 305-314.

- Zhang, J., Ferguson, S.S., Law, P.Y., Barak, L.S. et Caron, M.G. (1999) Agonist-specific regulation of delta-opioid receptor trafficking by G protein-coupled receptor kinase and beta-arrestin. *J Recept Signal Transduct Res*, **19**, 301-313.
- Zhang, X., Bao, L., Arvidsson, U., Elde, R. et Hokfelt, T. (1998) Localization and regulation of the delta-opioid receptor in dorsal root ganglia and spinal cord of the rat and monkey: evidence for association with the membrane of large dense-core vesicles. *Neuroscience*, **82**, 1225-1242.
- Zhang, X., Bao, L. et Ma, G.Q. (2010) Sorting of neuropeptides and neuropeptide receptors into secretory pathways. *Prog Neurobiol*, **90**, 276-283.
- Zhang, Z. et Pan, Z.Z. (2010) Synaptic mechanism for functional synergism between delta- and mu-opioid receptors. *J Neurosci*, **30**, 4735-4745.
- Zimmer, A., Zimmer, A.M., Baffi, J., Usdin, T., Reynolds, K., Konig, M., Palkovits, M. et Mezey, E. (1998) Hypoalgesia in mice with a targeted deletion of the tachykinin 1 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 2630-2635.